

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07C 237/08, 219/08, C07K 5/06, C12N 15/88	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/00241 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. Januar 1997 (03.01.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/02541 (22) Internationales Anmeldedatum: 12. Juni 1996 (12.06.96) (30) Prioritätsdaten: 195 21 412.9 14. Juni 1995 (14.06.95) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FERNHOLZ, Erhard [DE/DE]; Weidenstrasse 27, D-82362 Weilheim (DE). VON DER ELTZ, Herbert [DE/DE]; In der Au 21, D-82362 Weilheim (DE). HINZPETER, Matthias [DE/DE]; Baudererstrasse 19, D-80689 München (DE). (74) Anwälte: KNAUER, Martin usw.; Boehringer Mannheim GmbH, Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, HU, IL, JP, KR, MX, NO, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: NEW CATIONIC AND POLYCATIONIC AMPHIPHILES, REACTIVES CONTAINING THE SAME AND THEIR USE (54) Bezeichnung: NEUE KATIONISCHE UND POLYKATIONISCHE AMPHIPHILE, DIESE ENTHALTENDE REAGENZIEN UND DEREN VERWENDUNG (57) Abstract <p>New cationic and polycationic amphiphiles are capable of building aggregates with macromolecules, in particular DNA or RNA. Also disclosed is their insertion into prokaryotic and eucaryotic cells. Compounds with a spermyl-dioleoyloxypropyl structure have proven to be particularly advantageous.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft neue kationische bzw. polykationische Amphiphile, welche zur Aggregatbildung mit Makromolekülen, insbesondere mit DNA oder RNA befähigt sind, und deren Einschleusung in prokaryotische oder eukaryotische Zellen. Dabei haben sich Verbindungen mit Spermyl-dioleoyloxypropyl-Struktur als besonders vorteilhaft erwiesen.</p>		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Amenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Neue kationische und polykationische Amphiphile, diese enthaltende Reagenzien und deren Verwendung

Die Erfindung betrifft neue kationische bzw. polykationische Amphiphile, welche zur Aggregatbildung mit Makromolekülen, insbesondere mit DNA oder RNA befähigt sind, und deren Einschleusung in prokaryotische oder eukaryotische Zellen.

Amphiphile (z.B. Tenside, Detergenzien) spielen allgemein schon seit einiger Zeit eine Rolle im täglichen Leben. Kationische Amphiphile haben dagegen erst durch die Pionierarbeiten von Felgner in letzter Zeit größere Beachtung gefunden, da man mit ihrer Hilfe DNA und RNA in Zellen einschleusen und diese somit transfizieren kann (P.L. Felgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **84**, 7413-7417 (1987); P. Hawley-Nelson. WO 94/05624 et al., J.P. Behr, EP 0394111).

Die dabei verwendeten Reagenzien sehen im einzelnen sehr verschieden aus. Dies liegt zumeist daran, daß sie empirisch gefunden wurden. Man konnte also keine Verbindung gezielt für die hier zur Rede stehende Anwendung bereitstellen. Zudem läßt sich durch die Tatsache, daß es Verbindungen gibt, die nur im Gemisch mit anderen Reagenzien eine Wirkung zeigen, die ganze Komplexizität der Transfektion erkennen. Ein Überblick der meisten bislang gefundenen Reagenzien gibt Behr (*Bioconjugate Chem.*, **5**, 382-389 (1994) und darin angegebene Referenzen). Generell gilt jedoch, daß die überwiegende Anzahl der Reagenzien Liposomen bilden können.

Der Mechanismus der Transfektion mittels kationischer Amphiphile ist noch wenig verstanden. Daß die Liposomen durch ihre positive Ladung mit der DNA einen noch positiv geladenen Komplex bilden und dieser sich an die negativ polarisierte Zellmembran anlagert, erscheint noch plausibel (P.L. Felgner, *Nature* **337**, 387-388 (1989)). Wie die Durchdringung der Zellmembran und der Transport zum Zellkern geschieht, ist jedoch ungewiß.

Trotzdem lassen sich für neue Reagenzien neben der Transfektionseffizienz noch eine Reihe anderer Anforderungen formulieren:

- für die Effizienz sollten keine Vorbehandlungen der Zellen wie z.B. Permeabilisierung der Zellmembran durch DMSO, einem Detergenz wie z.B. Digitonin oder Ankratzern vonnöten sein.
- die Reagenzien sollten möglichst keine Toxizität zeigen, insbesondere nicht bei der effektivsten Konzentration und vorzugsweise biologisch abbaubar sein.
- sie sollten auf alle in Frage kommenden Zellen gleichermaßen verwendet werden können.

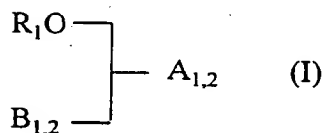
2

- sie sollten auf alle in Frage kommenden Zellen gleichermaßen verwendet werden können.
- sie sollten keine Spezifität gegenüber bestimmten DNA-Molekülen haben.
- sie sollten auch in vivo anwendbar sein. Dies bedeutet, daß neben der Toxizität auch die Verträglichkeit mit Serum eine bedeutende Rolle spielt. Gerade hier hat sich häufig eine drastische Abnahme der Transfektionseffizienz gezeigt.

Der Erfindung lag somit die Aufgabe zugrunde, entsprechende Reagenzien, die diesen Anforderungen gleichermaßen genügen, zur Verfügung zu stellen.

Die Aufgabe wird durch bestimmte kationische, lipidische Amphiphile gelöst, mit deren Hilfe sich anionische Verbindungen, wie z.B. DNA in Zellen einschleusen lassen, und die dabei überraschend verbesserte Eigenschaften im Hinblick der oben aufgeführten Anforderungen zeigen.

Insbesondere dienen als Amphiphile Verbindungen der allgemeinen Formel (I)



wobei

R_1 eine gesättigte oder ungesättigte $C(O)-C_{1-23}$ oder gesättigte oder ungesättigte C_{1-24} -Gruppe darstellt,

A_1 eine $O-R_2$ -Gruppe, wobei R_2 die für R_1 angegebene Bedeutung hat und gleich oder von R_1 verschieden sein kann,

A_2 einen NR_3X - oder einen $N^+R_3R_4R_5Y^-$ -Rest, wobei

R_3, R_4 , die untereinander gleich oder verschieden sein können, Wasserstoff, eine Alkylgruppe mit 1 bis 4 C-Atomen, eine $(CH_2)_n-OH$ - oder eine $(CH_2)_n-NH_2$ -Gruppe mit $n = 2-6$ bedeuten,

R_5 , welcher gleich oder verschieden von R_3 oder R_4 sein kann, Wasserstoff, eine Alkylgruppe mit 1 bis 4 C-Atomen, eine $(CH_2)_n-OH$ -, eine $(CH_2)_n$ -Halogenid-, oder eine $((CH_2)_mNH)_o-(CH_2)_n-NH_2$ -Gruppe bedeuten, wobei m eine ganze Zahl von 2 bis 6 ist und gleich oder verschieden von n oder o sein kann, wobei n eine Zahl von 2 bis 6 und o eine ganze Zahl von 0 bis 4 sein kann,

X zusätzlich zu der Bedeutung für R_5 , folgende Bedeutung haben kann: eine amidisch gebundene Aminosäure, ein amidisch gebundenes Peptid bzw.

3

- R_6 ein $-(CH_2)_m-NR_7R_8-$, ein $-(CH_2)_m-N^+(R_7)_2R_8$ oder ein $-(CH_2)_m-N^+(R_7)_3-$ -Rest
und m eine Zahl von 1 bis 5 sein kann,
- R_7 Wasserstoff oder eine Alkylgruppe mit 1 bis 4 C-Atomen,
- R_8 eine $-(CH_2)_n-N(R_7)_2-$ oder $-(CH_2)_n-N^+(R_7)_3-$ -Gruppe, wobei n eine Zahl von 2 bis 4 ist und R_7 die oben angegebene Bedeutung haben kann und
- Y ein pharmazeutisch akzeptables Anion ist,
- B_1 ein $NH[C(O)-(CH_2)_p-NH]_q-Z$ -Rest, wobei p eine Zahl von 1 bis 6 und q eine Zahl von 0 bis 2 ist,
- Z eine amidisch gebundene Aminosäure, ein amidisch gebundenes Peptid bzw. Polypeptid eine $-C(O)-CHR_6N(R_7)_2-$, eine $-C(O)-CHR_6N^+(R_7)_3-$, eine $C(O)-CHR_6N^+(R_7)_2R_8-$ oder eine $-C(O)-CHR_6NR_7R_8$ -Gruppe darstellen und R_6 bis R_8 und m die oben angegebenen Bedeutungen haben,
und
- B_2 die für A_1 angegebene Bedeutung haben kann und die Bedeutung von A_1 nur mit B_1 , die von A_2 nur mit B_2 gilt.

Bevorzugt sind dabei solche Verbindungen, bei denen die Reste R_1 und A_1 Alkylreste mit 10 bis 20 C-Atomen aufweisen. Darüber hinaus sind solche Verbindungen, in denen A_2 die Bedeutung NR_3X aufweist, bevorzugt, und zwar insbesondere solche, wobei R_3 Wasserstoff und X eine amidisch gebundene Aminosäure, ein geeignetes Aminosäurederivat, ein Peptid bzw. Polypeptid bedeuten.

Als pharmazeutisch akzeptables Anion, Y, kommen insbesondere Halogenide, Monomethylsulfat, Acetat, Trifluoroacetat und Phosphat in Betracht.

Als besonders geeignet haben sich folgende erfindungsgemäßen Verbindungen erwiesen:

2-(6-Carboxyspermyl)-1,3-dioleoyloxy-propylamid, 2-(N,N,N,N',N',N'-Hexamethylornithyl)-1,3-dioleoyloxy-propylamid, 1-(6-Carboxyspermyl)-2,3-dioleoyloxy-propylamid und/oder 2,3-Dioleoyloxy-N-(N-(spermyl)-glycyl)-aminopropan sowie entsprechende Derivate hiervon. Aber auch 2-(6-Carboxyspermyl)-1,3-dimyristoyloxy-propylamid, 2-(1,1,1,5,5,10,10,14,14,14-Decamethyl-6-carboxyspermyl)-1,3-dioleoyloxy-propylamid und/oder 2-(N,N,N,N',N',N'-Hexamethyllysyl)-1,3-dioleoyloxy-propylamid haben sich als geeignet erwiesen.

Des weiteren betrifft die vorliegende Anmeldung die Herstellung von Reagenzien mit Transfektionseigenschaft. Dabei können die neuen Reagenzien gleichermaßen als Lösung in einem wasser-mischbaren Lösungsmittel oder als wäßrige, liposomale Formulierung angewendet werden. Bei der Erprobung ihrer Transfektionseffizienz fiel auf,

sung in einem wasser-mischbaren Lösungsmittel oder als wäßrige, liposomale Formulierung angewendet werden. Bei der Erprobung ihrer Transfektionseffizienz fiel auf,

- daß sie in Serum-freiem Medium bereits eine meistens bessere Effizienz zeigen als andere kommerziell erhältliche Produkte,
- daß sie in Serum-freiem Medium überraschenderweise ein breiteres Plateau des DNA/Reagenz-Verhältnisses bei ähnlicher Transfektionseffizienz zuließen,
- daß sie überraschenderweise die gleiche oder eine bessere Effizienz in Serum-haltigen Medium zeigten,
- daß sich die Effizienz durch liposomale Formulierung noch steigern ließ,
- daß sich überraschenderweise die Verbindungen als weitaus weniger toxisch erwiesen als Verbindungen mit ähnlicher Transfektionseffizienz im Serum-freien System.

In den Abbildungen 1 und 2 sind die Transfektionseffizienzen einiger ausgewählter Verbindungen im Vergleich zu bekannten Reagenzien dargestellt.

Die Synthese der erfindungsgemäßen Verbindungen erfolgt nach dem für den Fachmann üblichen Methoden (J. March: *Advanced Organic Chemistry*; John Wiley & Sons, 1985 und M. Bodanszky; *Principles of Peptide Synthesis*; Springer Verlag, 1984), wobei die Endprodukte ggf. chromatographisch insbesondere durch Ionenaustauscherchromatographie gereinigt werden. Entsprechende Reaktionsschemata sind in den Abbildungen 3 bis 7 angeführt.

Voraussetzung für die Herstellung neuer Transfektionsreagenzien war, daß die entsprechenden Verbindungen kationisch und zur Aggregatbildung geeignet sind, da bislang vor allem solche geladenen Reagenzien zur Transfektion führten (es gibt Beispiele, bei welchen die DNA mittels ungeladener Reagenzien in die Zelle transponiert werden konnte. Hierzu müssen sie dann aber in Liposomen eingeschlossen sein, bei deren Darstellung das zu befördernde Molekül (z.B. DNA) u.U. geschädigt werden kann. Generell wurden durch solche Komplexe keine hohen Effizienzen erzielt (siehe z.B. A. Cudd, C. Nicolau in *Liposome Technology* (Gregoriadis Ed.), (1984) CRC Press Inc. Boca Raton, Fl.; S.F. Alino, M. Bobadilla, M. Garcia-Sanz, M. Lejarreta, F. Unda, E. Hilario in *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 174 (1993)).

Ein weiterer Ansatzpunkt war, daß die Verbindungen dazu imstande sein sollten, Liposomen zu bilden. Es ist dabei nicht klar, warum fast ausschließlich Liposomen-bildende Verbindungen zur Transfektion geeignet sind. Wie neueste Erkenntnisse (H. Gershon, R. Ghirlando, S.B. Guttman, A. Minsky in *Biochemistry* 32, 7143 (1993) und B. Sternberg, F.L. Sorgi, L. Huang in *FEBS Letters* 356, 361 (1994) zeigen, tragen sie zur Ausbildung von sog. Meatball-Spaghetti-Strukturen bei, welche zur Transfektion benötigt werden. Ob dies für alle Reagenzien gleichermaßen gilt und in welcher Form diese zum Passieren der Zellmembran beitragen, ist bis heute ungeklärt.

Aus diesen Überlegungen heraus resultierten die folgenden de novo-Synthesen, welche in den Schemata gemäß der Abbildungen 3 bis 7 dargestellt sind.

Für die Bereitstellung von entsprechenden Reagenzien wie beispielsweise pharmazeutischen Formulierungen stehen generell mehrere Methoden gemäß dem Stand der Technik zur Verfügung. Insbesondere werden liposomale und ethanolische Formulierungen verwendet, wobei sich bereits die verschiedenen Liposomen-Arten in ihrer Effizienz unterscheiden können (Zur Darstellung von Liposomen siehe z.B. H. Schreier in Pharmazie in unserer Zeit 11, 97 (1982)).

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können jedoch nicht nur als Liposomen, sondern auch in Form anderer Aggregate für die Transfektion verwendet werden. Sowohl bei der Liposomen- wie auch bei der Aggregatbildung können neben den erfindungsgemäßen Verbindungen zusätzlich andere lipidische Verbindungen zugegen sein. Hier sind beispielsweise Verbindungen aus der Klasse der Phospholipide geeignet; aber auch weitere dem Fachmann an sich bekannte Verbindungen können hier zum Einsatz kommen.

Es ist ebenso als überraschend anzusehen, daß sich bei den erfindungsgemäßen, hier erstmals beschriebenen Verbindungen des Typs 3, 6, 12 oder 15 (s. Beispiele 3, 6, 12 und 15) Liposomen erzeugen lassen.

Die Transfektionen wurden exemplarisch an HeLa-Zellen mit pSV2-CAT-Plasmid (Gorman, C.M. et al., Mol. Cell. Biol. 2, 1044-1051 (1982)) durchgeführt. Die Transfektionseffizienz wird durch den CAT-ELISA-Kit (Boehringer Mannheim GmbH) bestimmt und ist in den Abbildungen 1 und 2 im Vergleich zu bekannten Reagenzien dargestellt.

Wegen ihrer geringen Toxizität lassen sich diese Verbindungen (selbst oder in Verbindung mit anderen lipidischen Verbindungen) auch in vivo anwenden.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter:

Beispiel 1**Synthese von 2-(N-*tert.*-Butyloxycarbonyl-L-alanyl)-1,3-dihydroxy propylamid 1**

In einem Rundkolben mit Blasenähler wurden 756 mg (4 mmol) Boc-L-alanin und 600 μ l (4.3 mmol) Triethylamin, gelöst in 10 ml abs. THF, vorgelegt und auf -10 °C abgekühlt. Nun wurden 320 μ l (4 mmol) Chlorameisensäuremethylester zugegeben und 30 min bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von 456 mg (5 mmol) 2-Amino-1,3-propandiol wurde soviel Wasser zugesetzt, bis sich eine homogene Lösung bildete und noch 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des THF wurden 50 ml Ethylacetat zugegeben. Die organische Phase wurde mit ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels erhielt man 332 mg (32 %) eines farblosen Öls.

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1.32 (d; 3 H; J=7.1 Hz; CH-CH₃); 1.40 (s; 9 H; C(CH₃)₃); 3.55-3.85 (m; 4 H; CH (CH₂OH)₂); 3.85-4.0 (m; 1 H; NH-CH); 4.0-4.5 (m; 3 H; NH-CH, 2 x OH); 5.6-5.8 (m; 1 H; NH-CH (CH₂OH)₂); 7.0-7.35 (m; 1 H; OOC-NH-CH).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 18.4 (CH-CH₃); 28.2 (C(CH₃)₃); 52.2 (NH-CH-CO); 52.4 (CH(CH₂OH)₂); 61.8 (CH(CH₂OH)₂); 80.2 (C(CH₃)); 155.7 (NH-COO); 173.8 (CH-CO-NH).

Beispiel 2**Synthese von 2 (N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl)-1,3-dioleoyloxy propylamid 2**

In einem Rundkolben wurde eine Lösung von 598 mg (2.28 mmol) 1, 1.610 g (5.70 mmol) Ölsäure 1.176 g (5.70 mmol) DCC und 28 mg (0.23 mmol) Dimethylaminopyridin in 40 ml abs. CH_2Cl_2 über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde filtriert und das Filtrat einrotiert. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (Kieselgel, CH_2Cl_2 : MeOH = 30:1) gereinigt. Man erhielt 1.450 g, (80 %) eines farblosen Öls.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 0.87 (t; 6 H; $J=6.6$ Hz; 2 x $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1.15-1.5 (m; 43 H; CH-CH_3 , 2 x $\text{CO-(CH}_2)_2\text{-(CH}_2)_4$, 2 x $(\text{CH}_2)_6\text{-CH}_3$); 1.43 (s; 9 H; $\text{C(CH}_3)_3$); 1.5-1.7 (m; 4 H; 2 x $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2$); 1.9-2.1 (m; 8 H; 2 x $\text{CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2$); 2.30 (t; 4 H; $J=7.6$ Hz; 2 x CO-CH_2); 4.0-4.25 (m; 5 H; NH-CH , 2 x CH_2OOC); 4.35-4.5 (m; 1 H; NH-CH); 4.9-5.0 (m; 1 H; NH-CH-CH_2); 5.25-5.45 (m; 4 H; 2 x CH=CH); 6.5-6.65 (m; 1 H; OOC-NH-CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 14.0 (2 x C(18)H_3); 22.5 (2 x C(17)H_2); 24.7 (2 x C(3)H_2); 27.0, 27.1, 28.98, 29.04, 29.2, 29.4, 29.56, 29.62 {2 x [$\text{C(4)H}_2\text{-C(7)H}_2$, $\text{C(12)H}_2\text{-c(16)H}_2$]}); 28.1 ($\text{C(CH}_3)_3$); 31.8 (2 x C(2)H_2); 33.87, 33.88 {2 x [C(8)H_2 , C(11)H_2]}); 47.2 ($\text{CH(CH}_2\text{O}_2\text{C-R)}_2$); 62.4 ($\text{CH(CH}_2\text{O}_2\text{C-R)}_2$); 129.6, 129.9 (2 x CH=CH); 172.4 (CH-CO-NH); 173.4 ($\text{CH}_2\text{-COO}$).

Beispiel 3**Synthese von 2-L-Alanyl-1,3-dioleoyloxy-propylamid 3**

In einem Rundkolben mit Blasenähler wurden 702 mg (0.89 mmol) 2, gelöst in 6 ml abs. CH_2Cl_2 , vorgelegt und 2 ml (26.12 mmol) TFA zugegeben. Nach 30 min Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung in einem Scheidetrichter überführt und 50 ml CH_2Cl_2 sowie 28 ml 1 N NaOH zugegeben. Die organische Phase wurde mit 10 ml ges. NaHCO_3 -Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man 599 mg (97 %) eines fast farblosen Öls.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 0.75-0.9 (m; 6 H, 2 x $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1.1-1.4 (m; 43 H; CH-CH_3 , 2 x $\text{CO-(CH}_2)_2(\text{CH}_2)_4$, 2 x $(\text{CH}_2)_6\text{-CH}_3$); 1.4-1.7 (m; 6 H; NH_2 , 2 x $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2$); 1.85-2.1 (m; 8 H; 2 x $\text{CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2$); 2.30 (t; 4 H; $J=7.5$ Hz; 2 x CO-CH_2); 3.35-3.55 (m; 1 H; NH-CH); 4.0-4.25 (m; 4 H; 2 x CH_2OOC); 4.3-4.5 (m; 1 H; NH-CH); 5.2-5.4 (m; 4 H; 2 x CH=CH); 7.5-7.65 (m; 1 H; CO-NH-CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 14.0 (2 x C(18)H_3); 22.5 (2 x C(17)H_2); 24.7 (2 x C(3)H_2); 27.0, 27.1, 28.9, 29.0, 29.2, 29.4, 29.5, 29.6, {2 x [$\text{C(4)H}_2\text{-C(7)H}_2$, $\text{C(12)H}_2\text{-C(16)H}_2$]}; 31.7 (2 x C(2)H_2); 33.9 {2 x [C(8)H_2 , C(11)H_2]}; 46.7 ($\text{CH(CH}_2\text{O}_2\text{C-R)}_2$); 62.5 ($\text{CH(CH}_2\text{O}_2\text{C-R)}_2$); 129.5, 129.8 (2 x CH=CH); 173.3 (CH-CO-NH); 173.4 ($\text{CH}_2\text{-COO}$).

Beispiel 4**Synthese von 2-(N,N'-Di-*tert.*-butyloxycarbonyl-L-ornithyl)-1,3-dihydroxypropylamid 4**

In einem Rundkolben mit Blasenähler wurden 2.000 g (6 mmol) Boc-L-ornithin und 900 µl 6.45 mmol) Triethylamin gelöst in 25 ml abs. THF, vorgelegt und auf -10 °C abgekühlt. Nun wurden 480 µl (6 mmol) Chlorameisensäuremethylester zugegeben und 30 min bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von 684 mg (7.5 mmol) 2-Amino-1,3-propandiol wurde soviel Wasser zugesetzt, bis sich eine homogene Lösung bildete und noch 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurden in Ethylacetat aufgenommen, mit ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man 1.987 g (82 %) 4 als farblose Kristalle.

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1.42 (s; 9 H; C(CH₃)₃); 1.4-1.95 (m; 4 H; CH₂-CH₂-CH₂-NH); 3.0-3.2 (m; 2 H; CH₂NH); 3.6-3.8 (m; 4 H; CH(CH₂OH)₂); 3.9-4.05 (m; 1 H; NH-CH₂); 4.05-4.6 (m; 3 H; NH-CH₂, 2 x OH); 5.2-5.4 (m; 1 H; NH-CH); 5.8-6.05 (m; 1 H; NH-CH); 7.35-7.5 (m; 1 H, NH-CH).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 26.1 (CH₂-CH₂-CH₂-NH); 28.4 (C(CH₃)₃); 28.5 (C(CH₃)₃); 30.1 (CH₂-CH₂-NH); 40.0 (CH₂-NH); 52.9 (CH(CH₂OH)₂); 54.4 (NH-CH-CO); 61.8 (CH(CH₂OH)₂); 79.3 (C(CH₃)₃); 80.1 (C(CH₃)₃); 156.1 (NH-COO); 156.5 (NH-COO); 173.3 (CH-CO-NH).

Beispiel 5

Synthese von 2-(N,N'-Di-*tert.*-butyloxycarbonyl-L-lornithyl)-1,3-dioleoxypropylamid 5

In einem Rundkolben wurde eine Lösung von 1.898 g (4.68 mmol) 4, 3.305 g (11.7 mmol) Ölsäure, 2.414 g (11.7 mmol) DCC und 57 mg (0.47 mmol) Dimethylaminopyridin in 50 ml abs. CH_2Cl_2 über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde filtriert und das Filtrat einrotiert. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel (CH_2Cl_2 : MeOH = 30:1) gereinigt. Man erhielt 1.678 g (38%) des Produktes als farblosen, wachsartigen Feststoff Smp. 52 - 54 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 0.75-0.9 (m; 6 H, 2 x $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1.05-1.5 (m; 40 H; 2 x $\text{CO-(CH}_2)_2\text{-(CH}_2)_4$, 2 x $(\text{CH}_2)_6\text{-CH}_3$); 1.42 (s; 18 H; 2 x $\text{C(CH}_3)_3$); 1.45-1.85 (m; 8 H; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, 2 x $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2$); 1.85-2.1 (m; 8 H; 2 x $\text{CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2$); 2.2-2.35 (m; 4 H; 2 x CO-CH_2); 3.0-3.35 (2 m; 2 H; $\text{CH}_2\text{-NH}$); 4.0-4.25 (m; 5 H; NH-CH , 2 x CH_2OOC); 4.35-4.5 (m; 1 H, NH-CH); 4.7-4.8 (m; 1 H; NH-CH); 5.1-5.2 (m; 1 H, NH-CH); 5.2-5.4 (m; 4 H; 2 x CH=CH); 6.65-6.8 (m; 1 H; OOC-NH-CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 14.0 (2 x C(18)H_3); 22.5 (2 x C(17)H_2); 24.6 (2 x C(3)H_2); 26.2, ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$); 27.0, 27.1, 28.97, 29.04, 29.2, 29.4, 29.56, 29.61, {2 x [$\text{C(4)H}_2\text{-C(7)H}_2$, $\text{C(12)H}_2\text{-C(16)H}_2$] und $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$ }; 28.1, 28.3 (2 x $\text{C(CH}_3)_3$); 31.7 (2 x C(2)H_2); 33.85, 33.86 {2 x [C(8)H_2 , C(11)H_2]}; 47.2 ($\text{CH(CH}_2\text{O}_2\text{C-R)}_2$); 62.3 ($\text{CH(CH}_2\text{O}_2\text{C-R)}_2$); 129.6, 129.8 (2 x CH=CH); 156.3 (NH-COO); 173.30, 173.33 (CH-CO-NH , 2 x $\text{CH}_2\text{-COO}$).

//

Beispiel 6**Synthese von 2-L-Ornithyl-1,3-dioleoyloxy-propylamid 6**

In einem Rundkolben wurden 421 mg (0.451 mmol) 5, gelöst in 3 ml abs. CH_2Cl_2 , vorgelegt und 1 ml (13.06 mmol) TFA zugegeben. Nach 30 min. Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung mit 200 ml CH_2Cl_2 verdünnt, zweimal mit ges. NaHCO_3 -Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man 296 mg (89 %) eines fast farblosen Öls.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 0.86 (t; 6 H; J=6.7 Hz; 2 x $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1.1-1.45 (m; 40 H; 2 x $\text{CO-(CH}_2)_2\text{-(CH}_2)_4$, 2 x $(\text{CH}_2)_6\text{-CH}_3$); 1.45-1.7 (m; 8 H; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$, 2 x $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2$); 1.9-2.1 (m; 8 H; $\text{CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2$); 2.30 (t; 4 H; J = 7.5 Hz; 2 x CO-CH_2); 2.6-3.1 (m; 4 H; 2 x NH_2); 3.15-3.55 (m; 2 H; $\text{CH}_2\text{-NH}_2$); 3.55-3.75 (m; 1 H; NH-CH); 4.0-4.25 (m; 4 H; 2 x CH_2OOC); 4.3 - 4.5 (m; 1 H; NH-CH); 5.2-5.4 (m; 4 H; 2 x CH=CH); 7.65-7.75 (m; 1 H; CO-NHCH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 14.0 (2 x C(18)H_3); 22.5 (2 x C(17)H_2); 24.7 (2 x C(3)H_2); 26.99, 27.04, 29.1, 29.3, 29.5, 29.6 {2 x [$\text{C(4)H}_2\text{-C(7)H}_2$, $\text{C(12)H}_2\text{-C(16)H}_2$], $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{NH}$ }; 31.7 (2 x C(2)H_2); 33.9 (2 x [C(8)H_2 , C(11)H_2]); 46.7 ($\text{CH(CH}_2\text{O}_2\text{C-R)}_2$); 54.6 ($\text{NH}_2\text{-CH-CO}$); 62.5 ($\text{CH(CH}_2\text{O}_2\text{C-R)}_2$); 129.5, 129.8 (2 x CH=CH); 173.31, 173.6 (CH-CO-NH , 2 x $\text{CH}_2\text{-COO}$); 174.7 (CH-CO-NH).

Beispiel 7**Synthese von N-tert.-Butyloxycarbonyl-1,3-dihydroxy-propylamin 7**

In einem Rundkolben wurde eine Lösung von 1.07 ml (5 mmol) Boc_2O , 697 μl (5 mmol) Triethylamin und 456 mg (5 mmol) 2-Amino-1,3-propandiol in 10 ml THF/Wasser (1:1) über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des THF am Rotationsverdampfer wurden 50 ml Ethylacetat und 10 ml ges. NaCl-Lösung zugegeben. Die organische Phase wurde mit 10 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels erhielt man 589 mg (62 %) 7 als farblose Kristalle. Smp. 83 - 85 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 1.44 (s; 9 H; $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 3.4-3.85 (m; 7 H; $\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})_2$); 5.3-5.45 (m; 1 H; NH-CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 28.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 53.3 ($\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})_2$); 62.6 ($\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})_2$); 79.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 156.5 (NH-COO).

Beispiel 8**Synthese von *N-tert.-Butyloxycarbonyl-1,3-dioleoyloxy-propylamin* 8**

In einem Rundkolben wurde eine Lösung von 478 mg (2.5 mmol) 7, (1.695 g) (6 mmol) Ölsäure, 1.28 g (6 mmol) DCC und 12 mg (0.1 mmol) Dimethylaminopyridin in 25 ml abs. CH_2Cl_2 über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde filtriert und das Filtrat einrotiert. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Hexan: Ethylacetat = 5:1) gereinigt. Man erhielt 1.482 g (82 %) des Produktes als farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 0.86 (t; 6 H; $J=6.6$ Hz; 2 x CH_2CH_3); 1.1-1.5 (m; 40 H; 2 x $\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-(\text{CH}_2)_4$, 2 x $(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_3$); 1.43 (s; 9 H; $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1.5-1.7 (m; 4 H; 2 x $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$); 1.9-2.1 (m; 8 H; 2 x $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2$); 2.30 (t; 4 H; $J=7.5$ Hz; 2 x $\text{CO}-\text{CH}_2$); 3.95-4.25 (m; 5 H; $\text{NH}-\text{CH}$, 2 x CH_2OOC); 4.7-4.85 (m; 1 H; $\text{OOC}-\text{NH}-\text{CH}$); 5.25-5.45 (m; 4 H; 2 x $\text{CH}=\text{CH}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 14.0 (2 x $\text{C}(18)\text{H}_3$); 22.5 (2 x $\text{C}(17)\text{H}_2$); 24.7 (2 x $\text{C}(3)\text{H}_2$); 27.0, 27.1, 28.96, 29.02, 29.2, 29.4, 29.55, 29.62 {2 x [$\text{C}(4)\text{H}_2-\text{C}(7)\text{H}_2$, $\text{C}(12)\text{H}_2-\text{C}(16)\text{H}_2$]}; 28.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 31.8 (2 x $\text{C}(2)\text{H}_2$); 33.9 {2 x [$\text{C}(8)\text{H}_2$, $\text{C}(11)\text{H}_2$]}; 48.4 ($\text{CH}(\text{CH}_2\text{O}_2\text{C-R})_2$); 62.8 ($\text{CH}(\text{CH}_2\text{O}_2\text{C-R})_2$); 79.8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 129.6, 129.8 (2 x $\text{CH}=\text{CH}$); 154.9 ($\text{NH}-\text{COO}$); 173.3 (CH_2-COO).

Beispiel 9**Synthese von 1,3-Dioleoyloxy-2-propylamin 9**

In einem Rundkolben wurden 720 mg (1 mmol) 8, gelöst in 3 ml abs. CH_2Cl_2 , vorgelegt und 1 ml (13.06 mmol) TFA zugegeben. Nach 30 min Rühren wurde die Reaktionsmischung mit 50 ml CH_2Cl_2 verdünnt, mit 10 ml ges. NaHCO_3 -Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man 589 mg (95 %) eines farblosen Öls.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 0.87 (t; 6 H; $J=6.6$ Hz; 2 x $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1.1-1.5 (m; 40 H; 2 x $\text{CO-(CH}_2)_2\text{-(CH}_2)_4$, 2 x $(\text{CH}_2)_6\text{-CH}_3$); 1.35-1.5 (m; 2 H; CH-NH_2); 1.5-1.7 (m; 4 H; 2 x $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2$); 1.85-2.1 (m; 8 H; 2 x $\text{CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2$); 2.32 (t; 4 H; $J=7.5$ Hz; 2 x CO-CH_2); 3.2-3.35 (m; 1 H; CH-NH_2); 3.95-4.15 (m; 4 H; 2 x CH_2OOC); 5.25-5.45 (m; 4 H; 2 x CH=CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 14.0 (2 x C(18)H_3); 22.5 (2 x C(17)H_2); 24.8 (2 x C(3)H_2); 27.0, 27.1, 28.96, 28.99, 29.03, 29.2, 29.4, 29.55, 29.63 {2 x [$\text{C(4)H}_2\text{-C(7)H}_2$, $\text{C(12)H}_2\text{-C(16)H}_2$]}; 31.8 (2 x C(2)H_2); 34.0 {2 x [C(8)H_2 , C(11)H_2]}; 49 { $\text{CH(CH}_2\text{O}_2\text{C-R)}_2$ }; 65.7 { $\text{CH(CH}_2\text{O}_2\text{C-R)}_2$ }; 129.6, 129.9 (2 x CH=CH); 173.4 ($\text{CH}_2\text{-COO}$).

Beispiel 10**Synthese von 2-(N,N',N'',N'''-Tetra-*tert.*-butyloxycarbonyl-6-carboxy-spermyl)-1,3-dihydroxy-propylamid 10**

Zu einer Lösung von 202 mg (312 μ mol) Tetra-Boc-spermin und 47 μ l (335 μ mol) Triethylamin in 2 ml abs. THF wurden bei -10 °C 25 μ l (312 μ mol) Chlorameisensäuremethylester zugegeben und 30 min bei 0 °C gerührt.

Nach anschließender Zugabe von 36 mg (390 μ mol) 2-Amino-1,3-propandiol wurde soviel Wasser zugesetzt, bis sich eine homogene Lösung bildete und danach noch 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurden ca. 30 ml Ethylacetat zugegeben. Die organische Phase wurde mit ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man 208 mg (93 %) eines farblosen, schaumigen Feststoffs.

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1.3-1.47 (m; 36 H; 4 x C(CH₃)₃); 1.5-2.05 (m; 8 H, 2 x N-CH₂-CH₂-CH₂-N, N-CH-CH₂-CH₂-CH₂-N); 2.85-3.4 (m; 10 H; 5 x N-CH₂); 3.65-3.8 (m; 4 H; 2 x CH₂-OH); 3.8-4.5 (m; 4 H; 2 x -CH-, 2 x CH₂-OH); 4.8-5.1 (s(breit); 1 H; CH₂-NH); 5.25-5.4 (s(breit); 1 H; CH₂-NH); 7.05-7.15 (s(breit); 1 H, NH-CO).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 25.0, 29.5 (N-CH-CH₂-CH₂-CH₂-N); 28.0, 28.2, 28.3 (4 x C(CH₃)₃); 38.0, 38.1 (2 x N-CH₂-CH₂-CH₂-N); 42.9, 45.0, 47.0 (übrige Spermyl-CH₂-Kohlenstoffe); 52.4 (CH(CH₂-OH)₂); 59.8 (CH-CO); 63.1 (CH(CH₂-OH)₂); 79.3, 79.5, 81.1 (4 x CO-O-C(CH₃)₃); 156.0, 156.1 (4 x CO-O-C(CH₃)₃); 171.1 (CO-NH).

Beispiel 11

Synthese von 2-(N,N',N'',N'''-Tetra-*tert.*-butyloxycarbonyl-6-carboxy-spermyl)-1,3-dioleoyloxy-propylamid 11

In einem geschlossenen Rundkolben wurde eine Lösung von 208 mg (289 μ mol) 10, 204 mg (72 μ mol) Ölsäure, 149 mg (723 μ mol) DCC und 4 mg (29 μ mol) Dimethylaminopyridin in 6 ml abs. CH_2Cl_2 über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Danach wurde filtriert, mit Hexan/Ether (3:1) nachgewaschen und das Filtrat einrotiert. Nach Säulenchromatographie an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 20:1$) erhielt man 160 mg (44 %) eines farblosen Öls.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.8-0.95$ (m; 6 H; 2 x $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1.2-1.4 (m; 40 H; 2 x $\text{CO-(CH}_2)_2\text{-(CH}_2)_4$, 2 x $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$); 1.4-1.55 (m; 36 H; 4 x $\text{C(CH}_3)_3$); 1.55-1.75 (m; 10 H; 3 x $(\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-})_{\text{sperm}}$, 2 x $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$); 1.85-2.05 (m; 10 H; $(\text{-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-})_{\text{sperm}}$, 2 x $\text{CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-}$); 2.25-2.35 (m; 4 H; 2 x $\text{CO-CH}_2\text{-}$); 3.0-3.35 (m; 10 H; 5 x $\text{N-CH}_2\text{-}$); 4.0-4.4 (m; 6 H; 2 x CH-N , $(\text{CH(CH}_2\text{O}_2\text{C-R)})_2$); 4.5-5.1 (s(sehr breit); 1 H; $\text{NH-CH}_2\text{-}$); 5.25-5.35 (m; 4 H; 2 x CH=CH); 6.8-7.0 (s(breit); 1 H; NH-CO).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 14.4$ (2 x C(18)H_3); 23.0 (2 x C(17)H_2); 25.2 (2 x C(3)H_2); 27.6 (C(8)H_2 , C(11)H_2); 29.5, 29.6, 29.7, 29.9, 30.1, 32.3 ($(\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-})_{\text{sperm}}$, 2 x $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$, 2 x $\text{C(4)H}_2\text{-C(7)H}_2$, 2 x $\text{C(12)H}_2\text{-C(16)H}_2$); 28.7, 28.8 (4 x $\text{C(CH}_3)_3$); 34.0 (2 x C(2)H_2); 38.5, 44.6, 46.8, 47.6 (2 x $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$, $(\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-})_{\text{sperm}}$, $\text{CH(CH}_2\text{O}_2\text{C-R)}_2$); 59.5 (CO-CH); 62.8 ($\text{CH(CH}_2\text{O}_2\text{C-R)}_2$); 79.5, 80.1, 81.5 (4 x $\text{CO-O-C(CH}_3)_3$); 130.07, 130.37 (2x CH=CH); 156.3 (4 x $\text{CO-O-C(CH}_3)_3$); 173.7 (CO-NH , 2 x CH_2COO).

Beispiel 12**Synthese von 2-(6-Carboxy-spermyl)-1,3-dioleoyloxy-propylamid 12**

In einem Rundkolben mit Blasenähler wurden 85 mg (68 μ mol) 11 in 1 ml abs. CH_2Cl_2 gelöst und mit 400 μ l TFA versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 45 min lang bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit ca. 20 ml CH_2Cl_2 versetzt, mit ges. NaHCO_3 -Lösung gewaschen über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man 56 mg (97 %) eines farblosen Öls.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 0.8-0.95 (m; 6 H; 2 x $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1.15-1.4 (m; 40 H; 2 x $\text{CO-(CH}_2)_2\text{-(CH}_2)_4$, 2 x $(\text{CH}_2)_6\text{-CH}_3$); 1.5-1.9 (m; 12 H; 3 x $(\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-})_{\text{sperm}}$, 2 x $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $(\text{-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-})_{\text{sperm}}$); 1.9-2.1 (m; 8 H; 2 x $\text{CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2$); 2.2- 2.35 (m; 4 H; 2 x CO-CH_2); 2.45-3.3 (m; 10 H; 5 x N-CH_2); 4.0-4.59 (m; 12 H; 2 x CH-N , $(\text{CH}(\text{CH}_2\text{O}_2\text{C-R})_2$, 2 x NH_2 , 2 x NH_{sperm}); 5.25-5.45 (m; 4 H; 2 x CH=CH ; 7.6-7.9 (s(breit); 1 H; NH-CO).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 14.0 (2 x C(18)H_3); 22.5 (2 x C(17)H_2); 24.7 (2 x C(3)H_2); 27.0, 27.1 (C(8)H_2 , C(11)H_2); 29.0, 29.1, 29.2, 29.4, 29.60, 29.61, 31.8 ($(\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-})_{\text{sperm}}$, 2 x $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$, 2 x $\text{C(4)H}_2\text{-C(7)H}_2$, 2 x $\text{C(12)H}_2\text{-C(16)H}_2$); 33.9 (2 x C(2)H_2); 41.0, 47.3, 48.8 (2 x $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$, $(\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-})_{\text{sperm}}$, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{O}_2\text{C-R})_2$); 62.0, 62.9 (CO-CH , $\text{CH}(\text{CH}_2\text{O}_2\text{C-R})_2$); 129.5, 129.9 (2 x CH=CH); 173.4, 174.2 (CO-NH , 2 x CH_2COO).

Beispiel 13**Synthese von 2-Dimethylamino-1,3-propandiol 13**

In einem Rundkolben wurden 456 mg (5 mmol) 2-Amino-1,3-propandiol vorgelegt und unter Eiskühlung 1.13 ml (25 mmol) Ameisensäure (85 %, $d = 1.20$) versetzt. Anschließend wurden 895 μ l (12 mmol) Formaldehyd (37 %) zugefügt und die Mischung für 10 h im Wasserbad auf 80 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 3 ml 2 N Salzsäure zugesetzt. Die Isolation des Produktes erfolgte durch Chromatographie über 25 g sauren Ionenaustauscher (DOWEX). Das so erhaltene Rohprodukt wurde durch Kurzwegdestillation im Ölpumpenvakuum gereinigt. Man erhielt 253 mg (42 %) eines farblosen Öls.

Sdp. _{1mbar} = 105 °C

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ = 2.25 (s; 6 H; N(CH₃)₂); 2.31-2.45 (m; 1 H; CH(CH₂OH)₂); 3.35-3.55 (m; 4 H; CH(CH₂OH)₂); 4.24 (s(breit); 2 H; CH(CH₂OH)₂).

¹³C-NMR (DMSO-d₆): δ = 41.8 (N(CH₃)₂); 58.7 (CH(CH₂OH)₂); 66.7 (CHCH₂OH)₂).

Beispiel 14**Synthese von 2-Dimethylamino-(1,3-dioleoyloxy)-propan 14**

Eine Lösung von 183 mg (1.54 mmol) 13, 1.088 g (3.85 mmol) Ölsäure, 795 mg (3.85 mmol) DCC und 18 mg (154 μ mol) Dimethylaminopyridin in 20 ml abs. CH_2Cl_2 wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde filtriert, mit Hexan/Ether (3:1) nachgewaschen und das Filtrat einrotiert. Nach Säulenchromatographie an Kieselgel, ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 30:1) erhielt man 444 mg (45 %) des Produkts als farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 0.85-0.95 (m; 6 H; 2 x $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1.2-1.4 (m; 40 H; 2 x $\text{CO-(CH}_2)_2\text{-(CH}_2)_4$, 2 x $(\text{CH}_2)_6\text{-CH}_3$); 1.55-1.7 (m; 4 H; 2 x $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$); 1.95-2.05 (m; 8 H; 2 x $\text{CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2$); 2.3-2.35 (m; 4 H; 2 x $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$); 2.39 (s; 6 H, $\text{N(CH}_3)_2$); 2.9-3.0 (m; 1 H; $\text{CH(CH}_2\text{O}_2\text{C-R)}_2$); 4.1-4.3 (m; 4 H, $\text{CH(CH}_2\text{O}_2\text{C-R)}_2$); 5.3-5.4 (m, 4 H, 2 x CH=CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 14.4 (2 x C(18)H_3); 23.0 (2 x C(17)H_2); 25.3 (2 x C(3)H_2); 27.55, 27.6 (C(8)H_2 , C(11)H_2); 29.50, 29.53, 29.67, 29.7, 29.8, 29.9, 30.06, 30.14, 32.3 (2 x $\text{C(4)H}_2\text{-C(7)H}_2$, 2 x $\text{C(12)H}_2\text{-C(16)H}_2$); 34.7 (2 x C(2)H_2); 42.4 ($\text{N(CH}_3)_2$); 61.6, 61.9 ($\text{CH(CH}_2\text{O}_2\text{C-R)}_2$); 130.09, 130.36 (2 x CH=CH); 173.9 (2 x CH_2COO).

Beispiel 15**Synthese von N-[2-(1,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat 15**

Zu einer Lösung von 200 mg (309 μ mol) **14** in 1.55 ml Ethylacetat/Hexan (1:1) wurden bei 0 °C 66 μ l (696 μ mol) Dimethylsulfat zugefügt und die Reaktionsmischung für 24 h bei 4 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt. Man erhielt 213 mg (89 %) eines farblosen Öls.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 0.75-0.9 (m; 6 H; 2 x $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1.05-1.4 (m; 40 H; 2 x $\text{CO-(CH}_2)_2\text{-(CH}_2)_4$, 2 x $(\text{CH}_2)_6\text{-CH}_3$); 1.4-1.65 (m; 4 H; 2 x $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$); 1.8-2.1 (m; 8 H; 2 x $\text{CH}_2\text{-CH=CHCH}_2$); 2.25-2.4 (m; 4 H; 2 x $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$); 3.3-3.45 (s(breit); 9 H; $\text{N(CH}_3)_3$); 3.61 (s; 3 H; $\text{CH}_3\text{-O-S}$); 4.1-4.2 (m; 1 H; $\text{CH(CH}_2\text{O}_2\text{C-R)}_2$); 4.4-4.65 (m; 4 H; $\text{CH(CH}_2\text{O}_2\text{C-R)}_2$); 5.2-5.4 (m; 4 H; 2 x CH=CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 13.8 (2 x C(18)H_3); 22.4 (2 x C(17)H_2); 24.4 (2 x C(3)H_2); 26.9, 27.0 (C(8)H_2 , C(11)H_2); 28.8, 28.9, 29.0, 29.05, 29.3, 29.46, 29.5, 31.6 (2 x $\text{C(4)H}_2\text{-C(7)H}_2$, 2 x $\text{C(12)H}_2\text{-C(16)H}_2$); 33.6 (2 x C(2)H_2); 53.0, 54.0 ($\text{N(CH}_3)_3$, $\text{CH}_3\text{-O-S}$); 58.7 ($\text{CH(CH}_2\text{O}_2\text{C-R)}_2$); 69.8 ($\text{CH(CH}_2\text{O}_2\text{C-R)}_2$); 129.4, 129.8 (2 x CH=CH); 172.3 (2 x CH_2COO).

Beispiel 16**N,N',N'',N'''-Tetra-*tert.*-butyloxycarbonyl-6-carboxy-spermyl-2,3-dihydroxy-1-propylamid 16**

Eine Lösung von 300 mg (0.47 mmol) Tetra-BOC-carboxyspermin in 4 ml Dichlormethan wurde nacheinander mit 59 mg (0.51 mMol) Hydroxysuccinimid gelöst in 2 ml Dichlormethan/THF (1:1) und 106 mg (0.51 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid gelöst in 2.2 ml Dichlormethan ersetzt und 4 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in Essigsäureethylester aufgenommen, filtriert und aus dem klaren Filtrat das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand (335 mg (0.45 mMol) Tetra-BOC-Carboxyspermin-hydroxy-succinimidylester) wurde in 2.18 ml Dimethylformamid aufgenommen und mit 41 mg (0.45 mMol) (\pm)-1-Amino-2,3-propandiol und 61.5 μ l (0.45 mMol) Triethylamin versetzt. Nach 3tägigem Rühren entfernte man das Lösungsmittel und verteilte den Rückstand zwischen Ether und Wasser. Die organische Phase wird getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man ein öliges Produkt, das direkt weiterverwendet werden kann.

Beispiel 17**N,N',N'',N'''-Tetra-*tert.*-butyloxycarbonyl-6-carboxy-spermyl-2.3-dioleoyloxy-1-propylamid 17**

Eine Lösung von 252 mg (0.35 mMol) **16** in 1.4 ml Tetrachlorkohlenstoff wurde mit 218 mg (0.77 mMol) Ölsäure, 180 mg (0.87 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid und einer katalytischen Menge Dimethylaminopyridin versetzt. Es wurde über Nacht gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde der Rückstand chromatographiert (Kieselgel, Dichlormethan mit bis zu 10 % ansteigendem Methanolanteil). Man erhielt 392 mg (90 % d. Th.) eines Öls.

¹³C-NMR: δ = 173.8, 173.3 (Ölsre.-C=O), 156 (C(=O)-N), 130.0, 129.7 (Ölsre. C=C), 80.97, 79.67, 78.94 (quart.-BOC), 70.3 (Glyc. sn2), 62.6 (Glyc. sn1), 59.1 (Sperm.-), 46.5, 44.3, 43.7, 43.1 (Sperm. N-CH₂), 39.5 (Glyc. sn3), 38.2 (Sperm. N-CH₂), 34.9 (Ölsre. C-2), 31.9 (Ölsre. C-16), 29.8-29.1 (Ölsre.-CH₂), 28.4 (BOC-CH₃), 27.2 (Ölsre. C-8,11) 25.0 (Ölsre. C-3), 22.7 (Ölsre. C-17), 14.1 (Ölsre. C-18).

Beispiel 18**(6-Carboxy-spermyl)-2,3-dioleoyloxy-1-propylamid 18**

Eine Lösung von 195 mg (0.16 mmol) **17** in 5 ml Dichlormethan wurde bei Raumtemperatur mit 5 ml TFA versetzt. Nach 20 min. Rühren wurde mit 100 ml Dichlormethan verdünnt und mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet und das Lösungsmittel abgedampft. Man erhielt 134 mg (99 %) eines zähen Öls.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃/CD₃COOD 5:1) δ = 5.33 (Ölsre. 9, 10-H), 5.16 (Glycerin 2-H), 4.25 und 4.06 (Glycerin 1-H), 4.15 (Spermin- -H), 3.55 und 3.33 (Glycerin 3-H), 3.18 und 3.05 (Spermin N-CH₂), 2.31 (Ölsre. 2-H), 2.21 (Spermin -CH₂), 2.01 (Ölsre. 8, 11-H), 1.98 (Spermin-), 1.83 (Spermin CH₂), 1.57 (Ölsre. 3-H), 1.30 (Ölsre. 4-7, 12-17-H), 0.87 ppm (Ölsre. 18-H).

¹³C-NMR: δ = 173.82 und 173.53 (Ölsre. C-1), 154.06 (C(=O)-N), 130.17 u. 129.81 (Ölsre. C-9 u. C-10), 70 (Glycerin C-2), 63.2 (Glycerin C-1), 39.8 (Glycerin C-3), 34.25, 34.05, 33.97 (Ölsre. C-2), 32.70, 31.93 (Ölsre. C-16), 30.82; 29.79, 29.57 u. 29.35 (Ölsre. CH₂), 27.25 (Ölsre. C-8, 11) 25.64, 25.53, 25.32, 24.97 (Ölsre. C-3), 24.71, 22.70 (Ölsre. C-17), 14.13 ppm (Ölsre. C-18).
MS (FAB): MH⁺: 848.6 (Ber. 848.8).

Beispiel 19**Synthese von N-((N-Boc)-Glycyl)-aminopropan-2,3-diol 19**

10.00 g (36.73 mmol) Boc-Gly-OSu (Bachem) wurden zusammen mit 3.35 g (36.77 mmol) 1-Amino-2,3-propandiol in 50 ml DMF gelöst und 18 h gerührt. Das Produkt wurde durch Flashchromatographie ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$; 95:5 v/v) gereinigt. Man erhielt 8.94 g (98 %) 19 als farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 1.45 (s; 9 H; CH_3); 3.28 (m; 1 H; $\text{CH}_2\text{-OH}$); 3.39 (m; 1 H; $\text{CH}_2\text{-OH}$); 3.35 (m; 1 H; $\text{CH}_2\text{-N}_{\text{Aminoprop.}}$); 3.38 (m; 1 H; $\text{CH}_2\text{-N}_{\text{Aminoprop.}}$); 3.78 (s; 3 H; CH-OH ; $\text{CH}_2\text{-NH}_{\text{Gly}}$); 4.41 (br s; 1 H; OH); 4.67 (br s; 1 H; OH); 6.04 (tr; 1 H; NH); 7.45 (tr; 1 H; NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 28.4 (CH_3); 42.2 ($\text{CH}_2\text{-N}_{\text{Gly}}$); 44.0 ($\text{CH}_2\text{-N}_{\text{Aminoprop.}}$); 64.0 ($\text{CH}_2\text{-OH}$); 70.8 (CH-OH); 80.3 (quart. C_{Boc}); 156.6 (NCO_2); 174.5 (NCO).

Beispiel 20**Synthese von 2,3-Dioleoyloxy-N-((N-Boc)-glycyl)-aminopropan 20**

8.90 g (35.85 mmol) **19** wurden zusammen mit 22.70 g (110.02 mmol) DCC und 26.60 g (94.17 mmol) Ölsäure in 50 ml DMF gelöst. Dazu wurden 0.42 g (3.44 mmol) DMAP gegeben und 2 d gerührt. Danach wurde abfiltriert, einrotiert und das Produkt chromatographisch ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$; 99:1 v/v) gereinigt. Ausbeute: 19.25 g **20** als farbloses Öl (69 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 0.89 (tr; 6 H; CH_3 , Ölsäure); 1.30 (br s; 40 H; C- CH_2 -C); 1.45 (br s; 9 H; CH_3 , Boc); 1.62 (m; 4 H; CH_2 - CH_2 -C=O); 2.03 (m; 8 H; CH_2 -CH=CH); 2.32 (tr; 4 H; CH_2 -C=O); 3.42-3.57 (m; 2 H; CH_2 -N_{Aminoprop.}); 3.75 (d; 2 H; CH_2 -N_{Gly}); 4.12 (dd; 1 H; CH_2 -O_{Aminoprop.}); 4.27 (dd; 1 H; CH_2 -O_{Aminoprop.}); 5.08 (m; 1 H, CH-O); 5.20 (s; 1 H; NH); 5.34 (m; 4 H; CH=CH); 6.58 (tr; 1 H; NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 14.0 (CH_3 , Ölsäure); 22.7 (CH_2 , Ölsäure); 24.9 (CH_2 , Ölsäure); 27.2 (CH_2 , Ölsäure); 27.2 (CH_2 , Ölsäure); 28.3 (CH_2 , Ölsäure); 29.2 (CH_2 , Ölsäure); 29.3 (CH_3 , Boc); 29.5 (CH_2 , Ölsäure); 29.8 (CH_2 , Ölsäure); 31.9 (CH_2 , Ölsäure); 34.0 (CH_2 , Ölsäure); 34.2 (CH_2 , Ölsäure); 39.7 (CH_2 -N_{Gly}); 44.5 (CH_2 -N_{Aminoprop.}); 62.7 (CH_2 -O_{Aminoprop.}); 70.2 (CH-O_{Aminoprop.}); 80.3 (quart. C_{Boc}); 129.7 (CH=CH); 129.7 (CH=CH); 130.0 (CH=CH); 130.0 (CH=CH); 156.1 (NCO₂); 169.8 (NCO); 173.2 (CO_{Ölsäure}); 173.4 (CO_{Ölsäure}).

Beispiel 21**Synthese von 2,3-Dioleoyloxy-N-(glycyl)-aminopropan 21**

15.20 g (19.56 mmol) **20** wurden in 200 ml $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ (3:1 v/v) aufgenommen und 30 min gerührt. Danach wurde die Lösung mit 200 ml CH_2Cl_2 verdünnt und mit 200 ml ges. NaHCO_3 -Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und einrotiert. Ausbeute: 11.64 g (88 %) **21** als Öl.

^1H -NMR (CDCl_3): δ = 0.88 (tr; 6 H; CH_3); 1.29 (br s; 40 H; $\text{C-CH}_2\text{-C}$); 1.62 (m; 4 H; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{C=O}$); 1.82 (s; 2 H; $\text{CH}_2\text{-N}_{\text{Gly}}$); 2.01 (m; 8 H; $\text{CH}_2\text{-CH=CH}$); 2.32 (tr; tr; 4 H; $\text{CH}_2\text{C=O}$); 3.36 (s; 2 H; NH_2); 3.43-3.62 (m; 2 H; $\text{CH}_2\text{-N}_{\text{Aminoprop.}}$); 4.12 (dd; 1 H; $\text{CH}_2\text{-O}_{\text{Aminoprop.}}$); 4.28 (dd; 1 H; $\text{CH}_2\text{-O}_{\text{Aminoprop.}}$); 5.14 (m; 1 H; $\text{CH-O}_{\text{Aminoprop.}}$); 5.34 (m; 4 H; CH=CH); 7.60 (tr; 1 H; NH).

^{13}C -NMR (CDCl_3): δ = 14.0 (CH_3); 22.6 (CH_2 , Ölsäure); 24.8 (CH_2 , Ölsäure); 24.8 (CH_2 , Ölsäure); 27.1 (CH_2 , Ölsäure); 29.0 (CH_2 , Ölsäure); 29.1 (CH_2 , Ölsäure); 29.2 (CH_2 , Ölsäure); 29.4 (CH_2 , Ölsäure); 29.6 (CH_2 , Ölsäure); 31.8 (CH_2 , Ölsäure); 34.0 (CH_2 , Ölsäure); 34.2 (CH_2 , Ölsäure); 39.1 ($\text{CH}_2\text{-N}_{\text{Gly}}$); 44.5 ($\text{CH}_2\text{-N}_{\text{Aminoprop.}}$); 62.7 ($\text{CH}_2\text{-N}_{\text{Aminoprop.}}$); 129.6 (CH , Ölsäure); 129.9 (CH , Ölsäure); 173.1 (NCO); 173.1 (CO , Ölsäure); 173.3 (CO , Ölsäure).

Beispiel 22**Synthese von 2,3-Dioleoyloxy-N-(N-(N,N''',N''''-Tetra-*tert.*-butyloxycarbonyl-6-carboxy-spermyl)-glycyl)-aminopropan 22**

100 mg (0.15 mmol) **21** wurden zusammen mit 102 mg (0.16 mmol) (Boc)₄-Spermyl COOH und 39 mg (0.19 mmol) DCC in 1 ml CH₂Cl₂ gelöst und 18 h gerührt. Danach wurde von ausgefallenem DCH abfiltriert. Das Einengen und chromatographischer Aufreinigung (CH₂Cl₂/MeOH, 97:3) erhielt man 123.1 mg (63 %) **22** eines farblosen Öls.

¹H-NMR (CDCl₃ + 0.1 ml CD₃COOD): δ = 0.88 (tr; 6 H; CH₃, Ölsäure); 1.28 (br s; 40 H; C-CH₂-C_{Ölsäure}); 1.46 (br s; CH₃, Boc; CH₂, Spermyl); 1.62 (m; 4 H; CH₂CH₂C=O); 2.03 (m; 8 H; CH₂-CH=CH); 2.32 (m; 4 H; CH₂C=O); 3.00-3.33 (m; 10 H; CH₂, Spermyl); 3.33-3.62 (m; 2 H; CH₂-N_{Aminoprop.}); 3.95 (m; 2 H; CH₂-N_{Gly}); 4.10 (m; 1 H; CH₂-O); 4.28 (m; 1 H; CH₂-O); 4.30 (br s; 1 H; CH_{Spermyl}); 5.12 (m; 1 H; CH_{Aminoprop.}); 5.35 (m; 4 H; CH=CH).

¹³C-NMR (CDCl₃ + 0.1 ml CD₃COOD): δ = 14.1 (CH₃, Ölsäure); 22.8 (CH₂, Ölsäure); 25.0 (CH₂, Ölsäure); 27.3 (CH₂, Ölsäure); 27.3 (CH₂, Ölsäure); 28.4 (CH₃, Boc); 28.5 (CH₃, Boc); 29.3 (CH₂, Ölsäure); 29.3 (CH₂, Ölsäure); 29.4 (CH₂, Ölsäure); 29.7 (CH₂, Ölsäure); 29.9 (CH₂, Ölsäure); 32.0 (CH₂, Ölsäure); 34.2 (CH₂, Ölsäure); 39.7 (CH₂-N_{Gly}); 43.1 (CH₂-N_{Aminoprop.}); 63.0 (CH₂-O); 70.2 (CH-O); 79.6 (quart. C_{Boc}); 80.2 (quart. C_{Boc}); 80.9 (quart. C_{Boc}); 81.5 (quart. C_{Boc}); 129.8 (CH=CH); 130.1 (CH=CH); 155-158 (NCO₂); 173.6 (COO); 173.8 (COO).

Beispiel 23**Synthese von 2,3-Dioleoyloxy-N-(N-(6-carboxy-spermyl)-glycyl)-aminopropan 23**

1.00 g (0.77 mmol) **22** wurden in 100 ml $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ (3:1) gelöst und 30 min gerührt. Anschließend wurde vom Lösungsmittel befreit. Man erhielt 1.03 g (98.80 %) **23** als wachsartiges Produkt.

^1H -NMR (d_6 -DMSO): δ = 0.85 (tr; 6 H; CH_3 , Ölsäure); 1.23 (br s, 44 H, C- CH_2 -C_{Ölsäure/Spermyl}); 1.50 (m; 4 H; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$); 1.67 (m; 2 H; C- CH_2 -C_{Spermyl}); 1.83 (m; 2 H; C- CH_2 -C_{Spermyl}); 1.95 (m; 8 H; CH_2 -CH=CH); 2.23 (m; 4 H; $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$); 2.82-3.30 (m; 10 H; N- CH_2 , Spermyl); 3.26 (m; 1 H; CH_2 -N_{Aminoprop.}); 3.36 (m; 1 H, CH_2 -N_{Aminoprop.}); 3.74-3.88 (m; 2 H, CH_2 -N_{Gly}); 3.93 (br s; 1 H; $\text{CH}_{\text{Spermyl}}$); 4.01 (m; 1 H, CH_2 -O); 4.24 (m; 1 H; CH_2 -O); 5.02 (m; 1 H; $\text{CH}_{\text{Aminoprop.}}$); 5.31 (m; 4 H; CH=CH); 8.10 (br s; 6 H; NH); 8.33 (tr; 1 H; $\text{NHC}=\text{O}$); 8.98 (br s; 2 H, NH); 9.04 (tr; 1 H; $\text{NHC}=\text{O}$); 9.15 (br s; 1 H; NH); 9.50 (br s; 1 H; NH).

^{13}C -NMR (d_6 -DMSO): δ = 13.8 (CH_3 , Ölsäure); 20.9 (CH_2 , Sper); 22.1 (CH_2 , Ölsäure); 23.8, 23.9 (CH_2 , Sper); 24.4, 26.6 (CH_2 , Ölsäure); 26.9 (CH_2 , Sper); 28.5-29.1 (CH_2 , Ölsäure); 31.3 (CH_2 , Ölsäure); 33.4, 33.6 (CH_2 , Ölsäure); 36.2 (CH_2 , Sper); 38.7 (CH_2 , Sper); 41.8 (CH_2 -N_{Gly}); 43.0 CH_2 -N_{Aminoprop.}; 43.9, 46.2 (CH_2 , Sper); 58.8 (CH_{Sper}); 62.8 (CH_2 -O); 129.5 (CH=CH); 129.6 (CH=CH); 167.4, 168.5 ($\text{NCO}_{\text{Sper/Gly}}$); 172.2 (COO); 172.4 (COO).

Beispiel 24**Transfektion von adhärenenten HELA-Zellen mit CAT-Plasmid****1 Ausgangsmaterial**

1. Medium für die Stammkultur HELA (ATTC-Nr. CCL 2): MEM (with EARL's Salts), 10 % FCS, 2 mM Pyruvat, 2 mM Glutamin, 1 x n.e. Aminosäuren.

Für Transfektion gleiches Medium mit 5 % FCS und gleiches Medium ohne FCS ansetzen.

2. pSV2-CAT-Plasmid, in TE-Puffer, Konzentration: 1 mg/ml, 5 kb. (Gorman C.M. et al., Mol. Cell. Biol. 2, 1044-1051 (1982)).

3. Neue Transfektionsreagenzien:

in MES (MES, 20 mM; NaCl, 150 mM; pH 6.2), Konzentration 1.0 mg/ml, beschallt (Branson-Sonifier) und sterilfiltriert

oder

in 99.8%igem EtOH, Konzentration 2.5 mg/ml (nicht beschallt und nicht sterilfiltriert)

4. HEPES: Hepes, 20 mM; NaCl, 150 mM, pH 7.4, steril
5. PBS, BM-Ident.-Nr. 210 331 (10 mM Puffer, 150 mM Salz), steril und nicht steril
6. NaCl, 150 mM
7. Lysispuffer: MOPS, 10 mM; NaCl, 10 mM, EGTA, 1 mM, Triton-X-100, 1 %, pH 6.5.

2. Transfektionsansatz

Einen Tag vor Transfektion werden die Zellen in 6 cm Petrischalen umgesetzt: Dazu Zellen abtrypsinisieren und auf 2×10^5 Zellen/ml (Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer) in 5 % FCS-haltigem Medium verdünnen. 5 ml pro Schale. Inkubation im Brutschrank (bei 37 °C, 5 % CO₂).

Ansatz pro Schale für wäßrige Lösungen des Transfektionsreagenzes (TR):

1. 5 µg Plasmid (= 5 µl) mit HEPES ad 100 µl versetzen, vortexen.
2. 10 - 40 µg TR (= 10 - 40 µl) mit HEPES ad 100 µl versetzen, vortexen.
3. Lösungen aus 1. und 2. vereinigen, vorsichtig schütteln. 10 bis 15 min bei RT stehen lassen.
4. Während der Inkubationszeit Mediumwechsel in den Testschalen: Altes Medium absaugen und durch 3 ml Medium (5% FCS-haltig oder falls ohne FCS, Zellen 2 x mit PBS waschen) ersetzen.
5. Plasmid-TR-Gemisch aus 3. (200 µl) direkt ins frische Medium (mit oder ohne FCS) geben und durch vorsichtiges Schwenken der Schale gleichmäßig verteilen.
6. 6 h im Brutschrank (bei 37 °C, 5 % CO₂) inkubieren.
7. Dann das Medium auf eine Endkonzentration von FCS von 5 - 10 % aufstocken. Mediumendvolumen 6 ml.
8. 19 h im Brutschrank inkubieren.
9. Dann Ansatz komplett absaugen und durch 5 ml Medium mit 5 - 10 % FCS ersetzen.

Ansatz pro Schale für ethanolische Lösungen des TR:

A Ohne FCS im Medium:

1. 5 µg Plasmid (= 5 µl) + 500 µl Medium ohne FCS, vortexen.
2. 10 - 40 µg TR (= 4 - 16 µl) + 500 µl Medium ohne FCS, vortexen.
3. Zellen FCS-frei waschen: 5 ml Medium absaugen und 2 x mit PBS waschen; absaugen.
4. Lösungen aus 1. und 2. vereinigen, vorsichtig schütteln.
5. Plasmid-TR-Gemisch aus 4. (ca. 1020 µl) auf die gewaschenen Zellen geben und durch vorsichtiges Schwenken der Schale gleichmäßig verteilen.
6. 6 h im Brutschrank (bei 37 °C, 5 % CO₂) inkubieren.

7. Dann das Medium auf eine Endkonzentration von FCS von 5 - 10 % aufstocken. Mediumend
8. 18 h im Brutschrank inkubieren.
9. Dann Ansatz komplett absaugen und durch 5 ml Medium mit 5 - 10 % FCS ersetzen.

B Mit FCS im Medium:

1. 5 µg Plasmid (= 5 µl) + 150 µl NaCl, vortexen.
2. 10 - 40 µg TR (= 4 - 16 µl) + 150 µl NaCl, vortexen.
3. Lösungen aus 1. und 2. vereinigen, vorsichtig kurz schütteln. 15 min bei RT stehen lassen.
4. Während der Inkubationszeit Mediumwechsel in den Testschalen: Altes Medium absaugen und durch 1.5 ml Medium (10 % FCS-haltig) ersetzen.
5. Plasmid-TR-Gemisch aus 3. (ca. 320 µl) ins frische Medium geben und durch vorsichtiges Schwenken der Schale gleichmäßig verteilen.
6. 6 h im Brutschrank (bei 37 °C, 5 % CO₂) inkubieren.
7. Dann das Medium auf eine Endkonzentration von FCS von 5 - 10 % aufstocken. Mediumendvolumen 6 ml.
8. 18 h im Brutschrank inkubieren.
9. Dann Ansatz komplett absaugen und durch 5 ml Medium mit 5 - 10 % FCS ersetzen.

3. Zell-Lyse

1. Absaugen des Mediums und -3maliges Waschen der Zellen mit eiskaltem PBS.
2. Restflüssigkeit sorgfältig absaugen und 1 ml Lysispuffer pro Schale zugeben. Inkubation 30 min bei RT, Schalen ohne Schütteln stehen lassen.
3. Abnehmen des Zell-Lysates mit der Pipette und Überführen in 1,5 ml Eppendorftubes.
4. Abzentrifugieren der Lysate in der Tischzentrifuge, 3 min.
5. Überstand abnehmen und in ein frisches Gefäß überführen. Pellet verwerfen.

4. Proteinbestimmung der Lysate

Die Proteinbestimmung wird im Anschluß an die Lyse durchgeführt.

Analysiert wird mit der Proteinbestimmung nach Bradford (M. Bradford, Anal. Biochem. 72, 248 (1976)).

Für die weitere Untersuchung werden die Lysate eines Versuchsansatzes mit Samplebuffer (aus CAT-ELISA-Kit, Boehringer Mannheim, Kat.-Nr. 1363727) auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt (ca. 250 µg/ml).

5. Ermittlung der Transfektionseffizienz

Untersuchung der Lysate im CAT-ELISA (Boehringer Mannheim, Kat.-Nr. 1363727). Es werden je 200 µl der auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellten Lysate im ELISA eingesetzt.

Vergleich der Extinktionen ergibt Aufschluß über die Transfektionseffizienz.

Rekonstitution der Kit-Bestandteile und Verdünnen auf Arbeitskonzentration:

1. CAT-Standard, Flasche 1

Zu einer Flasche Lyophilisat 0,5 ml bidest. Wasser geben und durch Schütteln lösen. Die Konzentration (ng/ml) wird dem Etikettenaufdruck entnommen.

Arbeitsverdünnung:

Gelöstes Lyophilisat (Konzentration siehe Flaschenetikett) mit Probenverdünnungspuffer (Flasche 7) auf 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312, 0 ng/ml dünnen.

2. PAK <CAT> Dig, Flasche Z

Zu einer Flasche Lyophilisat 0,5 ml bidest. Wasser geben und durch Schütteln lösen (Konzentration = 0.2 mg/ml).

Arbeitsverdünnung:

Das gelöste Lyophilisat (0.2 mg/ml) mit Probenverdünnungspuffer (Flasche 7) auf 2 µg/ml verdünnen.

3. PAK<Dig>POD, Flasche 3

Zu einer Flasche Lyophilisat 0.5 ml bidest. Wasser geben und durch Schütteln lösen (Konzentration = 20 U/ml).

Arbeitsverdünnung:

Das gelöste Lyophilisat (20 U/ml) mit Probenverdünnungspuffer (Flasche 7) auf 150 mU/ml verdünnen.

4. Waschpuffer, Flasche 6

Gebrauchsfertiger Waschpuffer wird durch mischen von 1 Teil 10 x Waschpuffer (Fl. 6) mit 9 Teilen bidest. Wasser hergestellt. Der 1 x Waschpuffer wird für alle Waschschrte benötigt.

5. Probenverdünnungspuffer, Flasche 7

Im Wasserbad Flasche-Nr. 7 auf RT bringen. Ready to use.

6. POD-Substrat, Flasche 4

ABTS-1-Komponentensubstrat (Flasche Nr. 4), Ready to use, auf RT temperieren.

Durchführung

Die nachfolgende Tabelle bezieht sich auf die o. g. Puffer und Arbeitsverdünnungen. Die MTP-Module werden nach jedem Waschschrift auf mehrfachen Cellulosepapierschichten ausgeklopft.

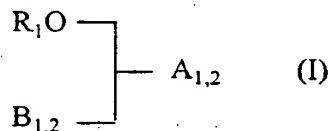
Für die Inkubationsschritte bei 37 °C wird die Platte mit einer MTP-Abdeckfolie beklebt.

	Arbeitsschritt	Volumen	Zeit	Temp.	Schütteln
1.	MTP-Modulstreifen entnehmen				—
2.	CAT-Enzym-Standard, Arbeitsverdünnungen oder Zell-Lysate	200 µl/well	60 min	37 °C	—
3.	Ausschütten, 3 x waschen mit Waschpuffer, ausklopfen	300 µl/well		18-25 °C	—
4.	PAK <CAT> DIG Arbeitsverdünnung	200 µl/well	60 min	37 °C	—
5.	Ausschütten, 3 x waschen mit Waschpuffer, ausklopfen	300 µl/well		18-25 °C	—
6.	PAK <DIG> POD Arbeitsverdünnung	200 µl/well	60 min	37 °C	—
7.	Ausschütten, 3 x waschen mit Waschpuffer, ausklopfen	300 µl/well		18-25 °C	—
8.	Substratlösung	200 µl/well	10 min	18-25 °C	+
9.	Messung bei 405 nm nach ca. 10 min Substratinkubation				

Die Ergebnisse sind in Abbildungen 1 und 2 dargestellt.

Patentansprüche

1. Verbindungen der allgemeinen Formel (I)



wobei

R_1 eine gesättigte oder ungesättigte $C(O)-C_{1-23}$ oder gesättigte oder ungesättigte C_{1-24} -Kette darstellt.

A_1 eine $O-R_2$ -Gruppe, wobei R_2 die für R_1 angegebene Bedeutung hat und gleich oder von R_1 verschieden sein kann.

A_2 einen NR_3X - oder einen $N^+R_3R_4R_5Y^-$ -Rest, wobei

R_3, R_4 , die untereinander gleich oder verschieden sein können, Wasserstoff, eine Alkylgruppe mit 1 bis 4 C-Atomen, eine $(CH_2)_n-OH$ - oder eine $(CH_2)_n-NH_2$ -Gruppe mit $n = 2-6$ bedeuten,

R_5 , welcher gleich oder verschieden von R_3 oder R_4 sein kann, Wasserstoff, eine Alkylgruppe mit 1 bis 4 C-Atomen, eine $(CH_2)_n-OH$ -, eine $(CH_2)_n$ -Halogenid-, oder eine $((CH_2)_mNH)_o-(CH_2)_n-NH_2$ -Gruppe bedeuten, wobei m eine ganze Zahl von 2 bis 6 ist und gleich oder verschieden von n oder o sein kann, wobei n eine Zahl von 2 bis 6 und o eine ganze Zahl von 0 bis 4 sein kann,

X zusätzlich zu der Bedeutung für R_5 , folgende Bedeutung haben kann: eine amidisch gebundene Aminosäure, ein amidisch gebundenes Peptid bzw. Polypeptid, eine $-C(O)-CHR_6N(R_7)_2$ -, eine $-C(O)-CHR_6N^+(R_7)_3$ -, eine $C(O)-CHR_6N^+(R_7)_2R_8$ - oder eine $-C(O)-CHR_6N R_7R_8$ -Gruppe, wobei

R_6 ein $-(CH_2)_m-NR_7R_8$ -, ein $-(CH_2)_m-N^+(R_7)_3$ - oder ein $(CH_2)_m-N^+(R_7)_2R_8$ -Rest und m eine Zahl von 1 bis 5 sein kann,

R_7 Wasserstoff oder eine Alkylgruppe mit 1 bis 4 C-Atomen,

R_8 eine $-(CH_2)_n-N(R_7)_2$ - oder $-(CH_2)_n-N^+(R_7)_3$ -Gruppe, wobei n eine Zahl von 2 bis 4 ist und R_7 die oben angegebene Bedeutung haben kann und

Y ein pharmazeutisch akzeptables Anion ist.

$B1$ ein $NH[C(O)-(CH_2)_p-NH]_q-Z$ -Rest, wobei p eine Zahl von 1 bis 6 und q eine Zahl von 0 bis 2 ist,

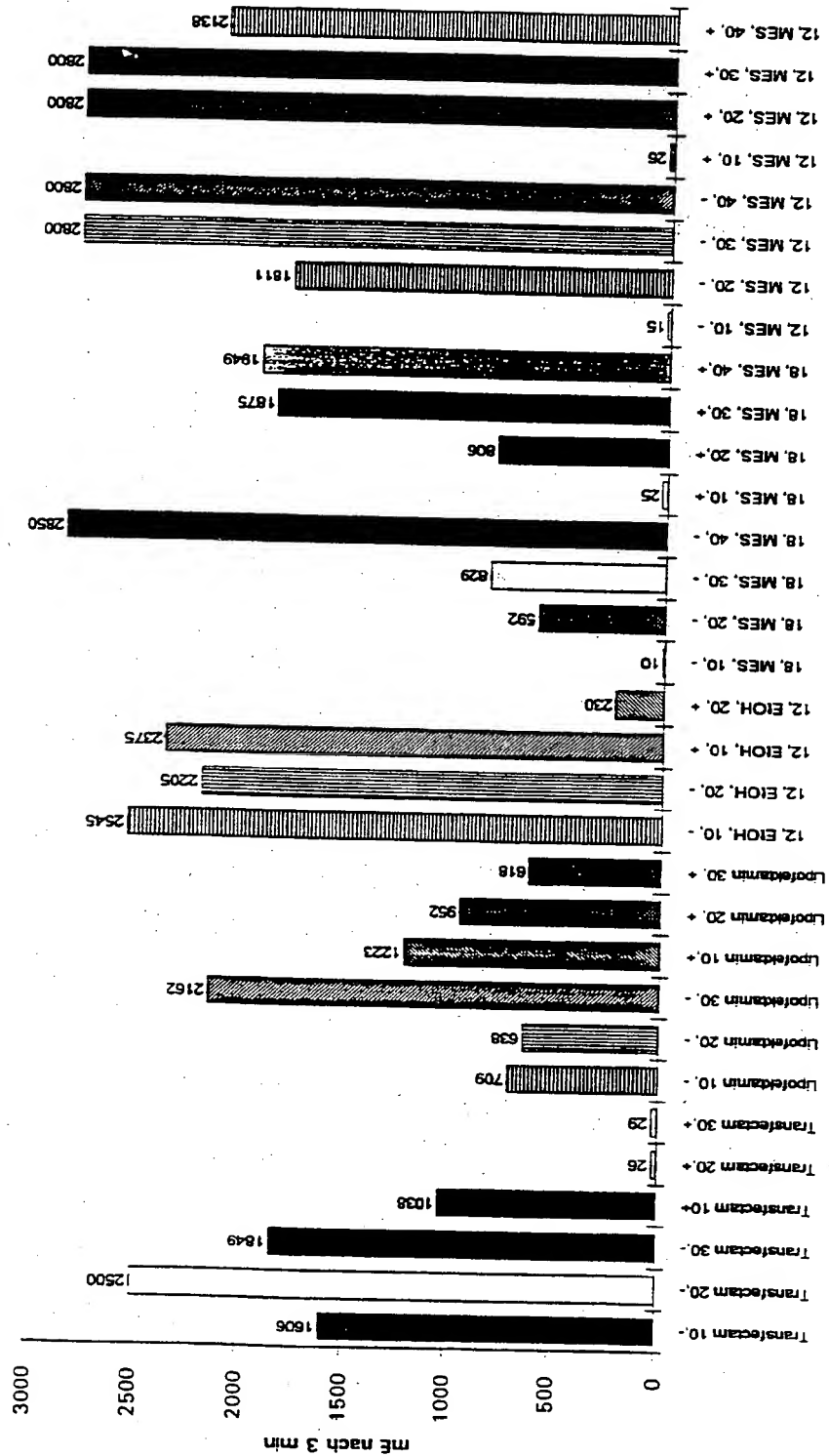
- Z eine amidisch gebundene Aminosäure, ein amidisch gebundenes Peptid bzw. Polypeptid eine $-C(O)-CHR_6N(R_7)_2$ -, eine $-C(O)-CHR_6N^+(R_7)_3$ -, eine $C(O)-CHR_6N^+(R_7)_2R_8$ - oder eine $-C(O)-CHR_6NR_7R_8$ -Gruppe darstellen und R_6 bis R_8 und m die oben angegebenen Bedeutungen haben, und
- B₂ die für A₁ angegebene Bedeutung haben kann und die Bedeutung von A₁ nur mit B₁, die von A₂ nur mit B₂ gilt.
2. Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Rest R₁ eine gesättigte oder ungesättigte C₁₀₋₂₀- oder C(O)₁₀₋₂₀-Gruppe darstellt.
 3. Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Bedeutung von A₂NR₃X mit R₃ Wasserstoff und X eine amidisch gebundene Aminosäure, ein Aminosäurederivat, ein Peptid bzw. Polypeptid ist.
 4. Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Bedeutung von B₁ ein NH(C(O)-(CH₂)_p-NH)_q-Z-Rest, wobei p die Zahl 1 oder 5, q 0 oder 1 und Z eine $-C(O)-CHR_6N(R_7)_2$ -, eine $-C(O)-CHR_6N^+(R_7)_3$ -, eine $-C(O)-CHR_6N^+(R_7)_2R_8$ -Gruppe ist und R_6 bis R_8 die zuvor angegebenen Bedeutungen haben.
 5. Verbindungen nach Anspruch 1, 2, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß Y ein Halogenid, Monomethylsulfat, Acetat, Trifluoroacetat oder Phosphat bedeutet.
 6. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um 2-(6-Carboxyspermyl)-1,3-dioleoyloxy-propylamid, 1-(6-Carboxyspermyl)-2,3-dioleoyloxy-propylamid, 2,3-Dioleoyloxy-N-(N-(6-carboxyspermyl)-glycyl)-aminopropan, 2-(6-Carboxyspermyl)-1,3-dimyristoyloxy-propylamid, 2-(1,1,1,5,5,10,10,14,14,14-Deca-methyl-6-carboxylspermyl)-1,3-dioleoyloxy-propylamid, 2-(N,N,N,N',N',N'-Hexamethylornithyl)-1,3-dioleoyloxy-propylamid und/oder 2-(N,N,N,N',N',N'-Hexamethyllysyl)-1,3-dioleoyloxy-propylamid handelt.
 7. Reagenz bestehend aus mindestens einer Verbindung der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung ein wassermischbares Lösungsmittel enthält.
 8. Reagenz nach Anspruch 7 dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung ein Gemisch bestehend aus mindestens einer Verbindung gemäß der allgemeinen Formel (I) und einer anderen lipidischen Verbindung in wassermischbaren Lösungsmitteln enthält.
 9. Reagenz nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem wassermischbaren Lösungsmittel um einen niedrigen Alkohol handelt.

10. Reagenz dadurch gekennzeichnet, daß eine oder mehrere Verbindungen der Ansprüche 1 bis 6 gegebenenfalls in Gegenwart anderer lipidischer Verbindungen in Form von Liposomen oder anderen Aggregaten vorliegen.
11. Verfahren zur Einschleusung von (Bio-)Molekülen in Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß ein Reagenz der Ansprüche 7 bis 10 verwendet wird und dieses zuerst mit einem anionischen Biomolekül und anschließend zur Transfektion mit Zellen in Kontakt gebracht wird.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den einzuschleusenden Molekülen um DNA oder RNA handelt.
13. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das anionische Biomolekül DNA oder ein entsprechendes Fragment ist.
14. Verfahren nach Anspruch 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß 2-(6-carboxyspermyl)-1,3-dioleoyloxy-propylamid, 1-(6-Carboxyspermyl)-2,3-dioleoyloxy-propylamid, 2,3-dioleoyloxy-N-(N-(6-Carboxyspermyl)-glycyl)-aminopropan, 2-(6-carboxyspermyl)-1,3-dimyristoyloxy-propylamid, 2-(1,1,1,5,5,10,10,14,14,14-Decamethyl-6-carboxylspermyl)-1,3-dioleoyloxy-propylamid, 2-(N,N,N,N',N',N'-Hexamethylornithyl)-1,3-dioleoyloxy-propylamid und/oder 2-(N,N,N,N',N',N'-Hexamethyllysyl)-1,3-dioleoyloxy-propylamid alleine oder gegebenenfalls in Gegenwart einer oder mehrerer anderer lipidischer Verbindungen verwendet wird.

7/1

Abb. 7

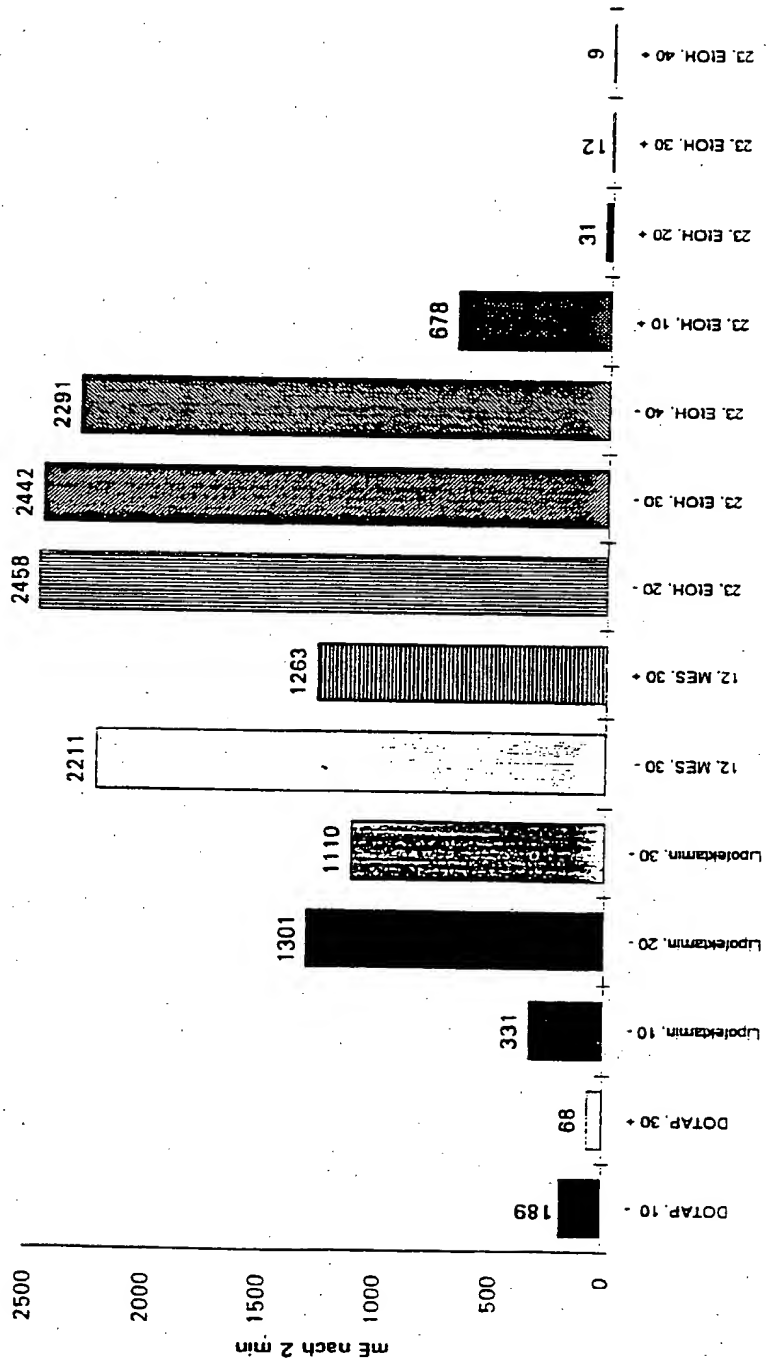
Transfektion in Hela-Zellen



2/7

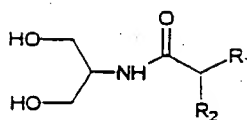
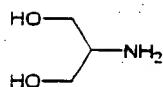
Abb. 2

Vergleich Transfektion Hela-Zellen

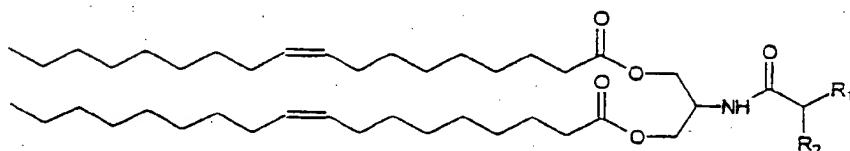


$\frac{3}{7}$

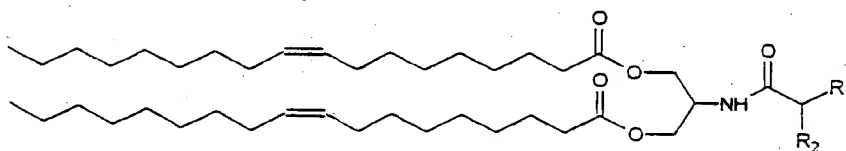
Abb. 3



- 1 : R₁ = CH₃; R₂ = NHBoc
4 : R₁ = (CH₂)₃-NHBoc; R₂ = NHBoc
10 : R₁ = (CH₂)₃-NBoc-(CH₂)₃-NHBoc; R₂ = N(Boc)-(CH₂)₃-NHBoc



- 2 : $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{NH}Boc$
 5 : $R_1 = (\text{CH}_2)_3\text{-NH}Boc$; $R_2 = \text{NH}Boc$
 11: $R_1 = (\text{CH}_2)_3\text{-NBoc-(CH}_2)_3\text{-NH}Boc$; $R_2 = \text{N(Boc)-(CH}_2)_3\text{-NH}Boc$



- 3 : $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{NH}_2$
 6 : $R_1 = (\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$; $R_2 = \text{NH}_2$
 12: $R_1 = (\text{CH}_2)_3\text{-NH-(CH}_2)_3\text{-NH}_2$; $R_2 = \text{NH-(CH}_2)_3\text{-NH}_2$

4/7

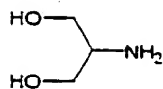
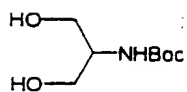
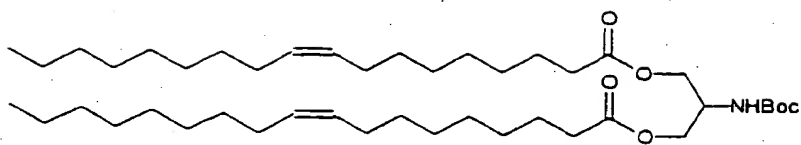


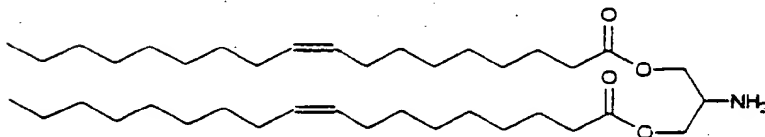
Abb. 4



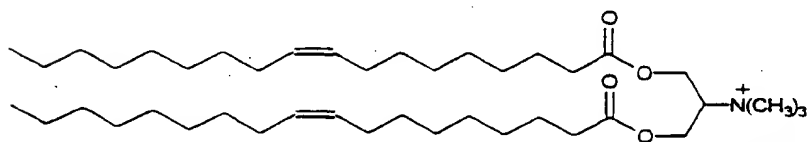
7



8



9

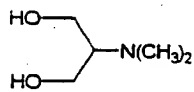
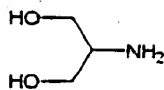


15

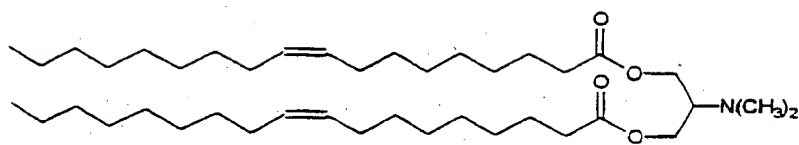
MeSO₄⁻

5/7

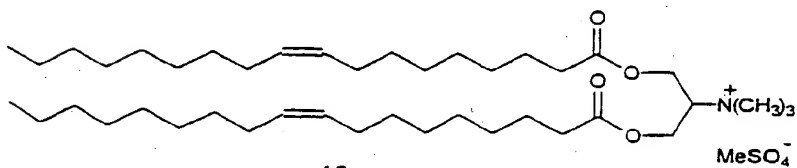
Abb. 5



13



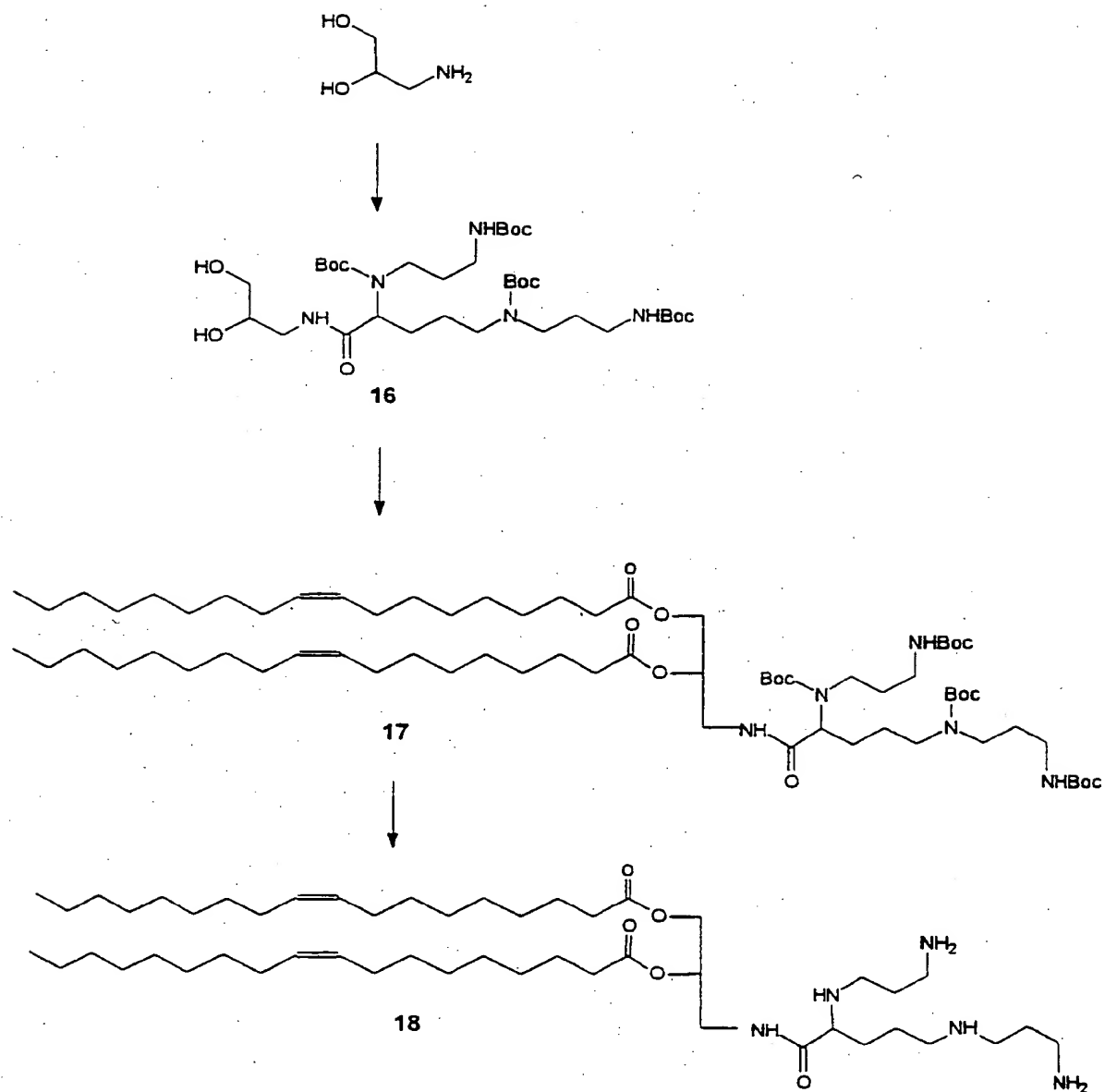
14



15

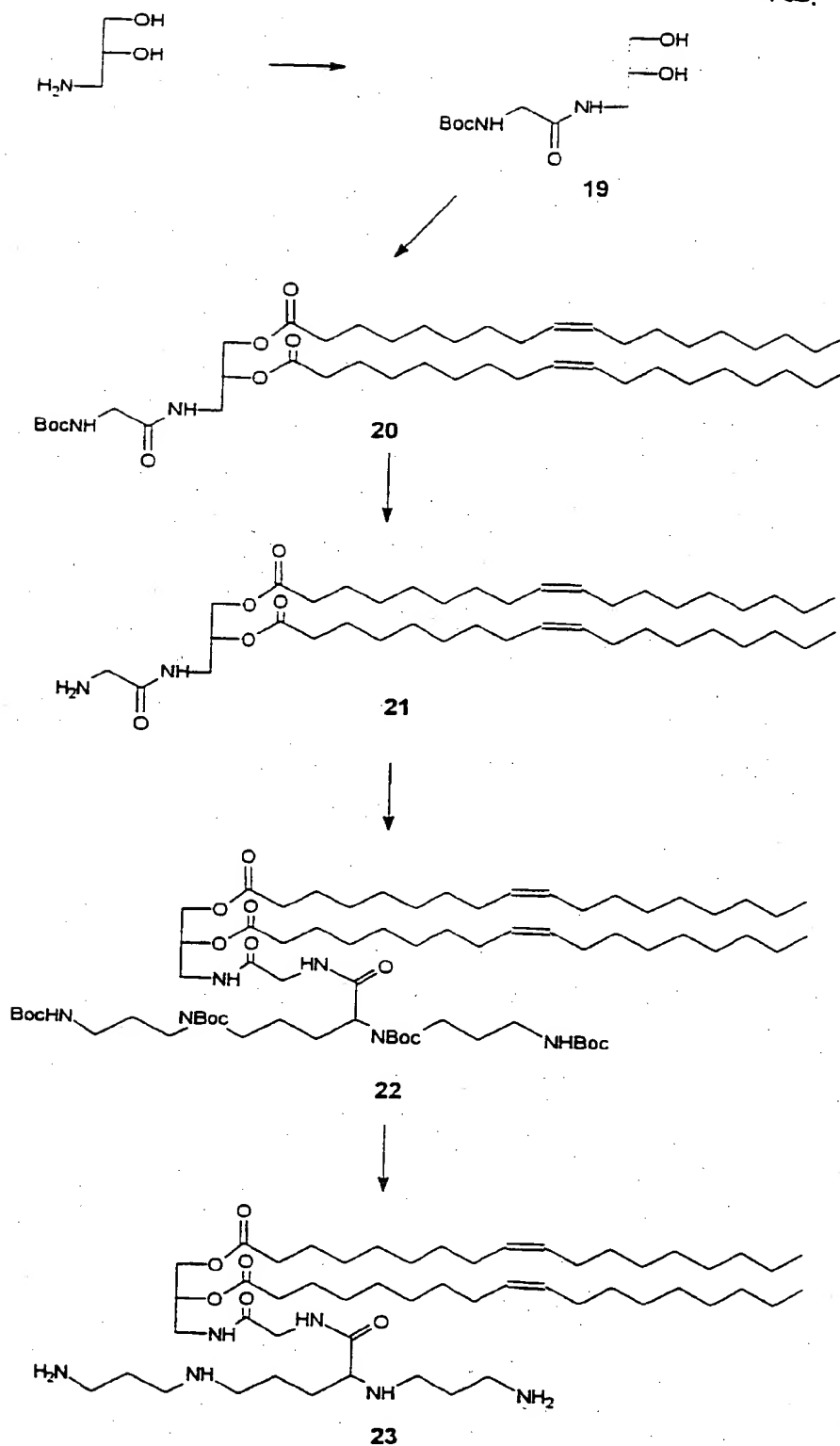
6/7

Abb. 6



7/7

Abb. 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No
PCT/EP 96/02541

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07C237/08 C07C219/06 C07K5/06 C12N15/88

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE,A,28 35 369 (PFIZER) 22 February 1979 see examples 43,45 ---	1,2,5
X	JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 73, no. 8, 6 August 1951, DC US, pages 3921-3922, XP002015346 HERMANN SCHLENK ET AL.: "The Synthesis of C14-Labeled Glycerol" see page 3922, column 1, line 34 - line 50 --- -/--	1,5

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 October 1996

Date of mailing of the international search report

16-10-96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Zervas, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/EP 96/02541

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 59, no. 8, 14 October 1963 Columbus, Ohio, US; abstract no. 8586b, H. P. KAUFMANN ET AL.: "Derivatives of aliphatic diesters of dihydroxyacetone" XP002015348 & NAHRUNG, vol. 1, no. 2, 1963, pages 95-105, see abstract	1,2
A	--- PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 84, November 1987, WASHINGTON US, pages 7413-7417, XP002015347 PHILIP L. FELGNER ET AL.: "Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure" cited in the application see the whole document	1-14
A	--- WO,A,94 05624 (LIFE TECHNOLOGIES) 17 March 1994 cited in the application see claims	1-14
A	--- BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 5, no. 5, 1994, WASHINGTON US, pages 382-389, XP000465949 JEAN-PAUL BEHR: "Gene Transfer with Synthetic Cationic Amphiphiles: Prospects for Gene Therapy" cited in the application see the whole document -----	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Interns I Application No

PCT/EP 96/02541

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE-A-2835369	22-02-79	US-A- 4166132	28-08-79
		AR-A- 219543	29-08-80
		AR-A- 218733	30-06-80
		AT-B- 363922	10-09-81
		AT-B- 372073	25-08-83
		AT-B- 372082	25-08-83
		AT-B- 373867	27-02-84
		AU-A- 503079	23-08-79
		BE-A- 869793	19-02-79
		CA-A- 1102354	02-06-81
		CA-A- 1114400	15-12-81
		CA-A- 1121358	06-04-82
		CH-A- 634544	15-02-83
		DE-C- 2857415	07-02-85
		DE-C- 2857416	24-05-84
		EG-A- 13438	31-12-81
		FR-A- 2421871	02-11-79
		FR-A- 2414038	03-08-79
		GB-A,B 2005248	19-04-79
		JP-C- 1255468	12-03-85
		JP-A- 57167913	16-10-82
		JP-B- 59029582	21-07-84
		JP-C- 1250170	14-02-85
		JP-A- 57167966	16-10-82
		JP-B- 59024144	07-06-84
		JP-C- 1198272	21-03-84
		JP-A- 54041807	03-04-79
		JP-B- 58029939	25-06-83
		LU-A- 80114	21-04-80
		NL-A- 7808565	20-02-79
		NL-A- 8002719	29-08-80
		SE-B- 447823	15-12-86
		SE-A- 7808701	19-02-79
		SE-B- 463456	26-11-90
		SE-A- 8401849	03-04-84
		SE-A- 8401850	03-04-84
		SU-A- 893128	23-12-81
		US-A- 4193999	18-03-80
		US-A- 4215146	29-07-80
		US-A- 4262021	14-04-81

Information on patent family members

PCT/EP 96/02541

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen

PCT/EP 96/02541

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C07C237/08 C07C219/08 C07K5/06 C12N15/88

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE,A,28 35 369 (PFIZER) 22.Februar 1979 siehe Beispiele 43,45	1,2,5
X	JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, Bd. 73, Nr. 8, 6.August 1951, DC US, Seiten 3921-3922, XP002015346 HERMANN SCHLENK ET AL.: "The Synthesis of C14-Labeled Glycerol" siehe Seite 3922, Spalte 1, Zeile 34 - Zeile 50	1,5



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8.Oktober 1996

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

16.10.96

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tlx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Zervas, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internal ss Aktenzeichen
PCT/EP 96/02541

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 59, no. 8, 14.Oktober 1963 Columbus, Ohio, US; abstract no. 8586b, H. P. KAUFMANN ET AL. : "Derivatives of aliphatic diesters of dihydroxyacetone" XP002015348 & NAHRUNG, Bd. 1, Nr. 2, 1963, Seiten 95-105, siehe Zusammenfassung ---	1,2
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, Bd. 84, November 1987, WASHINGTON US, Seiten 7413-7417, XP002015347 PHILIP L. FELGNER ET AL.: "Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-14
A	WO,A,94 05624 (LIFE TECHNOLOGIES) 17.März 1994 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche ---	1-14
A	BIOCONJUGATE CHEMISTRY, Bd. 5, Nr. 5, 1994, WASHINGTON US, Seiten 382-389, XP000465949 JEAN-PAUL BEHR: "Gene Transfer with Synthetic Cationic Amphiphiles: Prospects for Gene Therapy" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1-14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat. es Aktenzeichen
PCT/EP 96/02541

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE-A-2835369	22-02-79	US-A- 4166132	28-08-79
		AR-A- 219543	29-08-80
		AR-A- 218733	30-06-80
		AT-B- 363922	10-09-81
		AT-B- 372073	25-08-83
		AT-B- 372082	25-08-83
		AT-B- 373867	27-02-84
		AU-A- 503079	23-08-79
		BE-A- 869793	19-02-79
		CA-A- 1102354	02-06-81
		CA-A- 1114400	15-12-81
		CA-A- 1121358	06-04-82
		CH-A- 634544	15-02-83
		DE-C- 2857415	07-02-85
		DE-C- 2857416	24-05-84
		EG-A- 13438	31-12-81
		FR-A- 2421871	02-11-79
		FR-A- 2414038	03-08-79
		GB-A, B 2005248	19-04-79
		JP-C- 1255468	12-03-85
		JP-A- 57167913	16-10-82
		JP-B- 59029582	21-07-84
		JP-C- 1250170	14-02-85
		JP-A- 57167966	16-10-82
		JP-B- 59024144	07-06-84
		JP-C- 1198272	21-03-84
		JP-A- 54041807	03-04-79
		JP-B- 58029939	25-06-83
		LU-A- 80114	21-04-80
		NL-A- 7808565	20-02-79
		NL-A- 8002719	29-08-80
		SE-B- 447823	15-12-86
		SE-A- 7808701	19-02-79
		SE-B- 463456	26-11-90
		SE-A- 8401849	03-04-84
		SE-A- 8401850	03-04-84
		SU-A- 893128	23-12-81
		US-A- 4193999	18-03-80
		US-A- 4215146	29-07-80
		US-A- 4262021	14-04-81

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

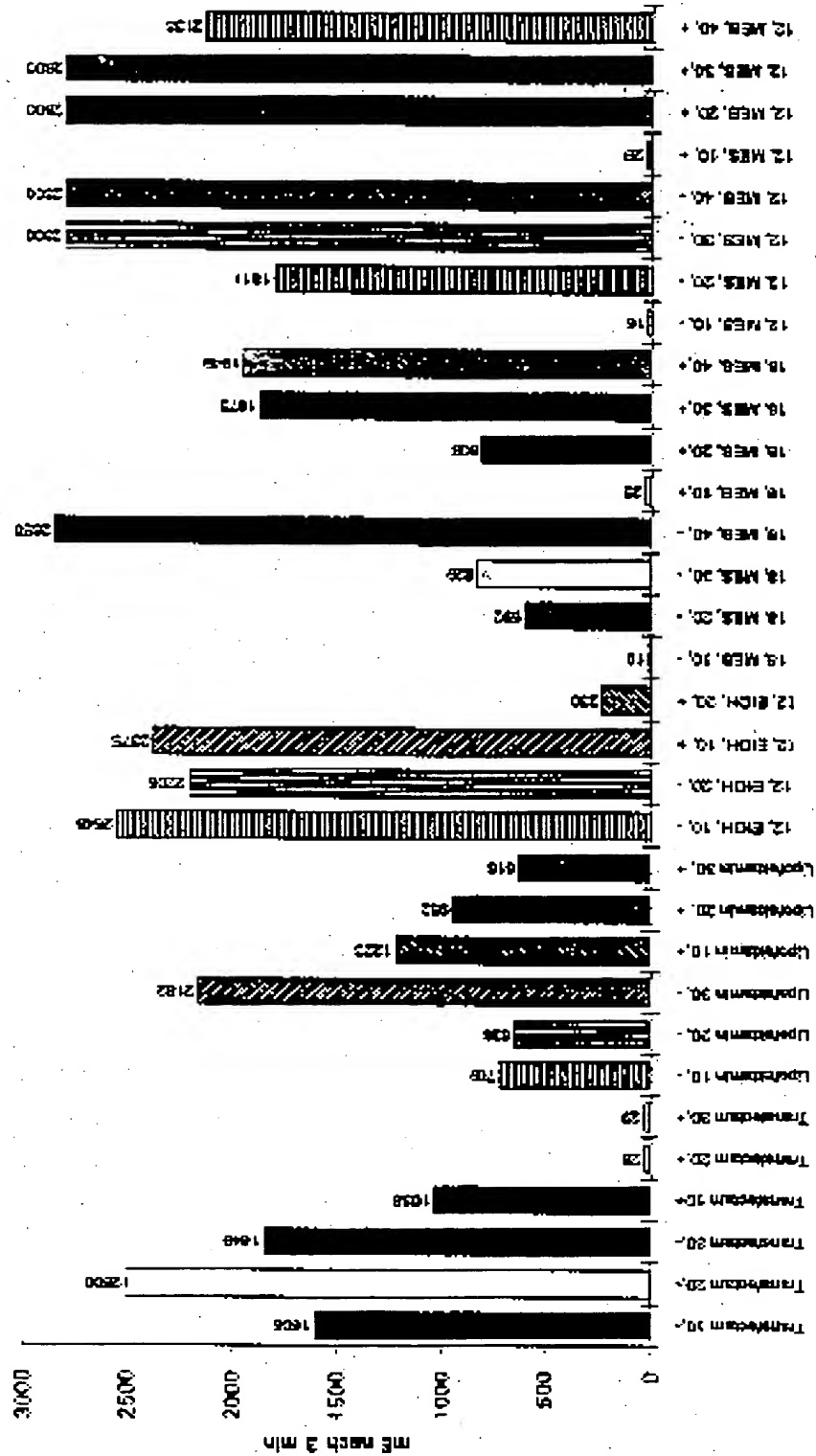
PCT/EP 96/02541

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)

7/7

Abb. 7

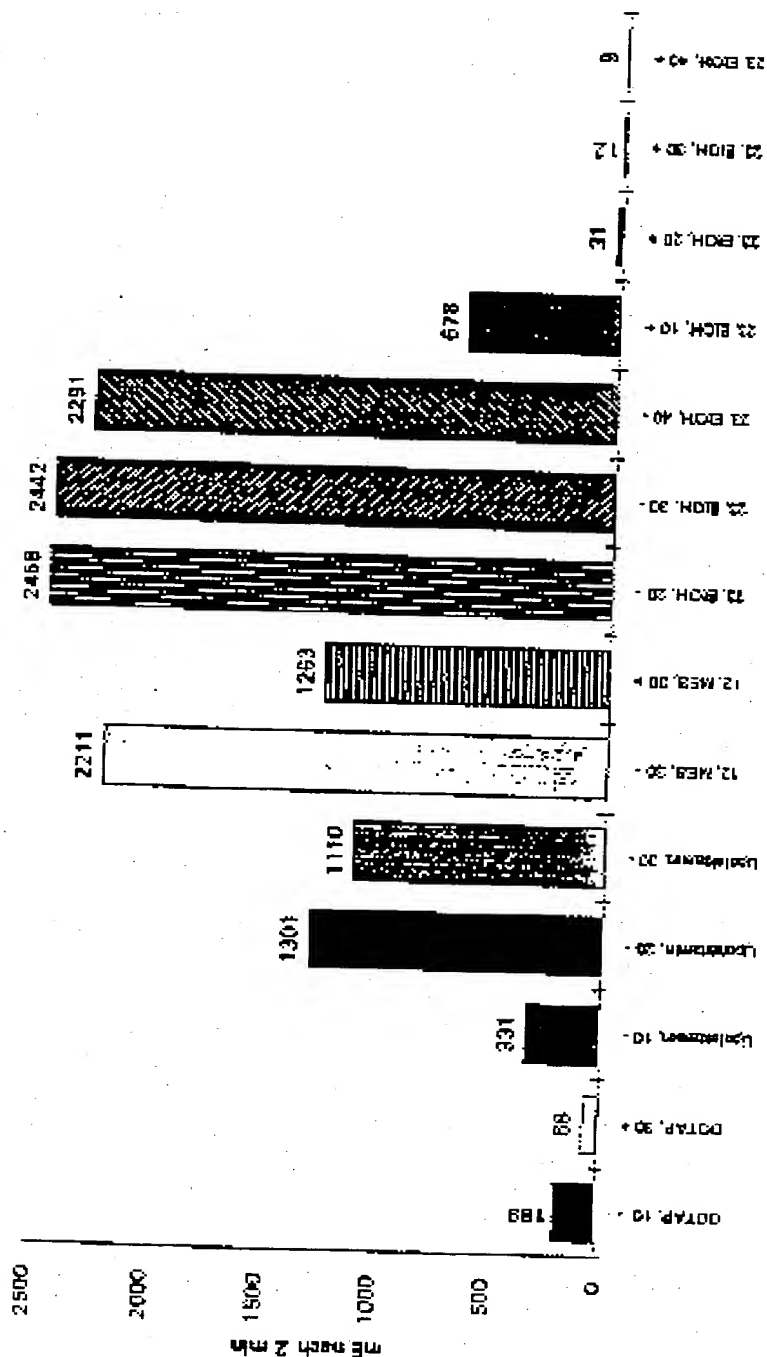
Transfektion in Hela-Zellen



2/7

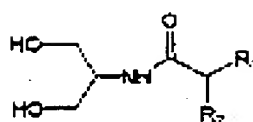
Abb. 2

Vergleich Transfektion HeLa-Zellen



3/7

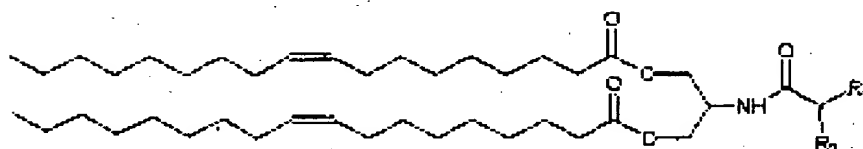
APP. 3



1 : $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{NHEcc}$

4 : R₁ = (CH₂)₃-NHBoc; R₂ = NHBoc.

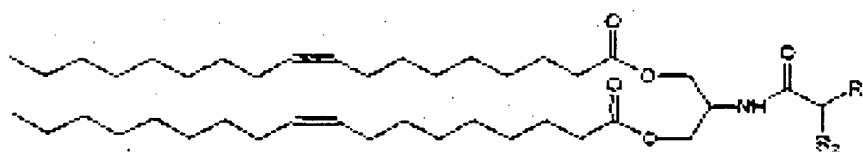
10: $R_1 = (CH_2)_3-NBoc-(CH_2)_3-NHBoc$, $R_2 = N(Boc)-(CH_2)_3-NHBoc$



2: R₁ = CH₃; R₂ = NHBoc

5 : $R_1 = (CH_2)_3-NHBoc$; $R_2 = NHBoc$

11: R₁ = (CH₂)₃-NBoc-(CH₂)₃-NH-Boc; R₂ = N(Boc)-(CH₂)₃-NH-Boc



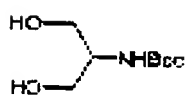
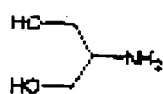
3 : $R_1 = CH_3$; $R_2 = NH_2$

5: $R_1 = (CH_2)_3-NH_2$; $R_2 = NH_2$

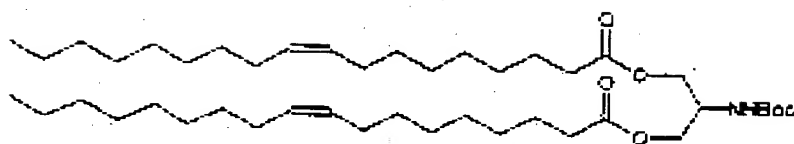
12: $R_1 = (CH_2)_3-NH-(CH_2)_3-NH_2$; $R_2 = NH-(CH_2)_3-NH_2$

4/7

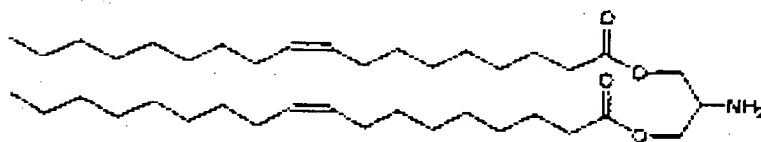
Abb. 4



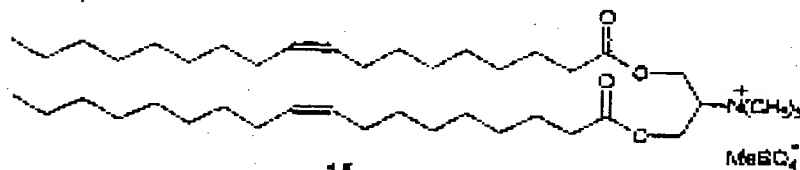
3



5



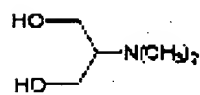
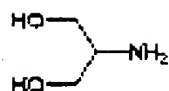
2



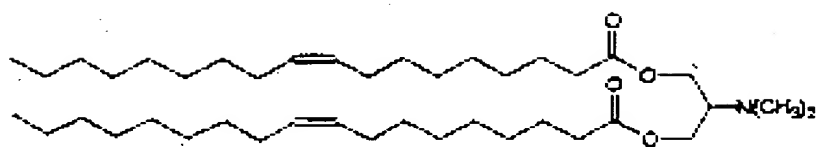
15

5/7

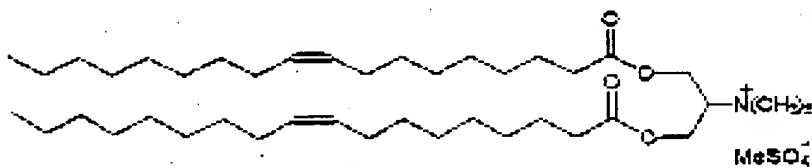
Abb. 5



13



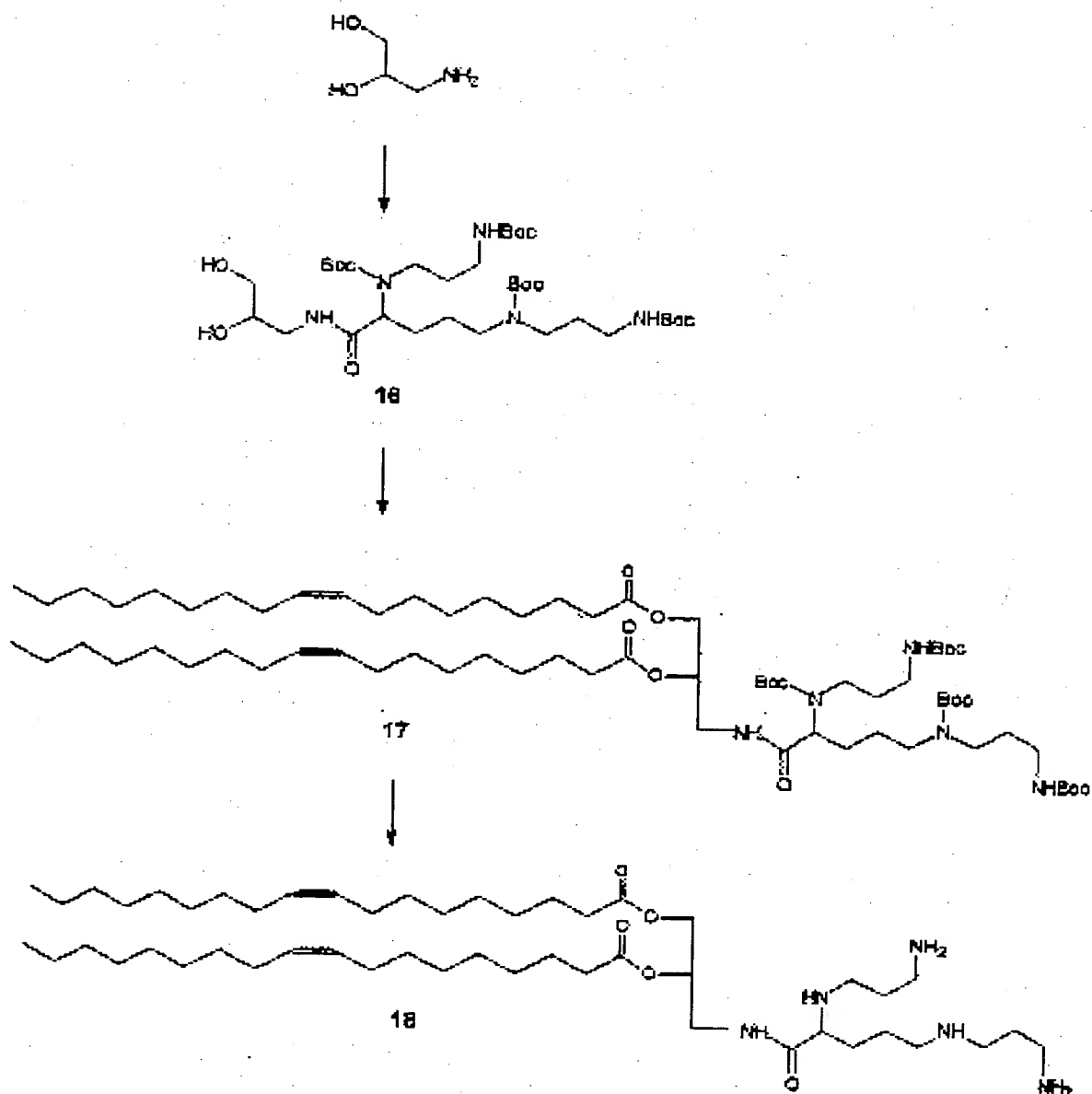
14



15

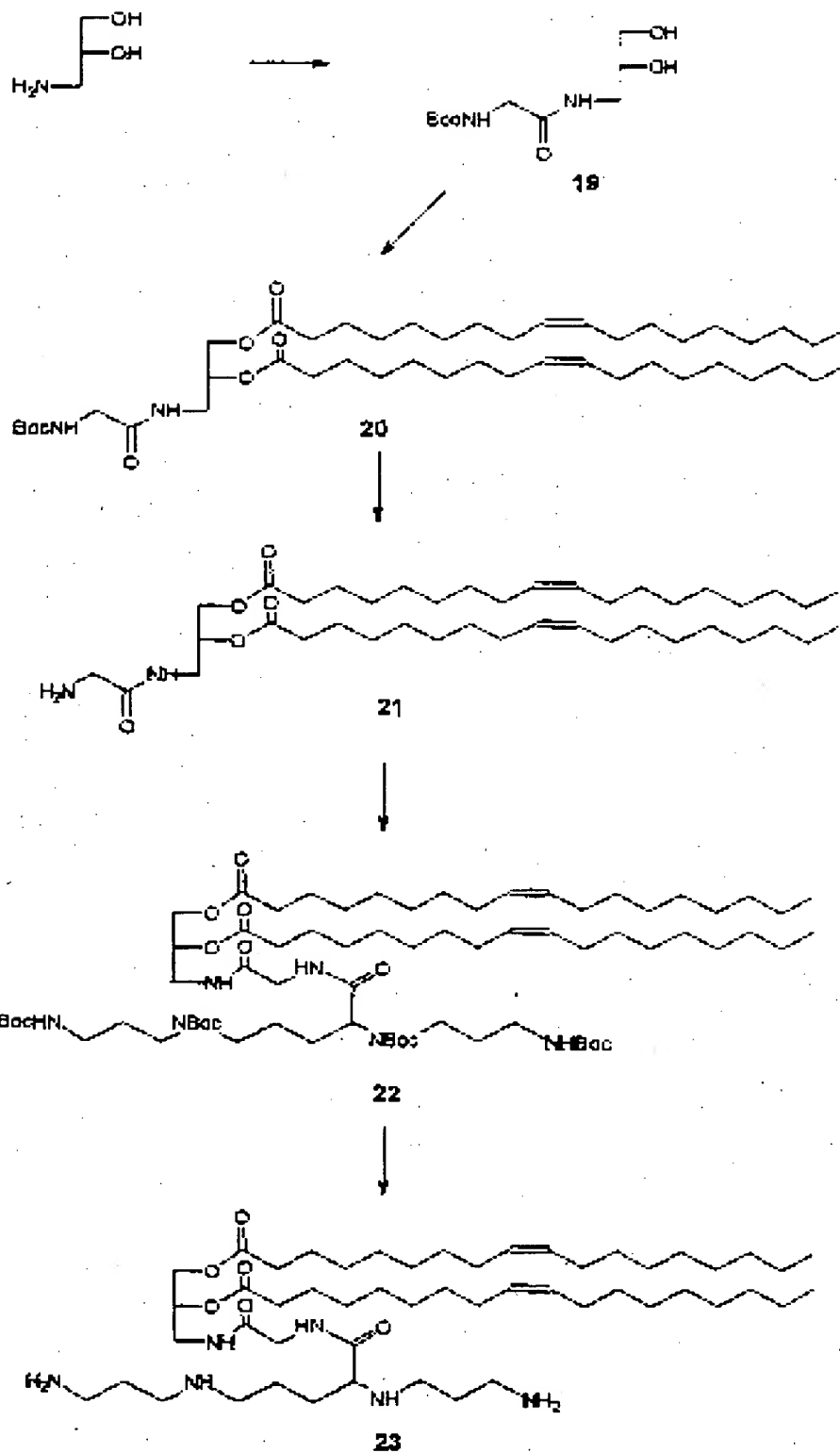
b/7

Abb. 6



7/7

Abb. 7



THIS PAGE BLANK (USPTO)